

UNTERSUCHUNGEN ZU STÖRUNGEN IM
FRUKTOSESTOFFWECHSEL UNTER BESONDERER
BERÜCKSICHTIGUNG DER BEDEUTUNG VON FRUKTOSE-
2,6-BISPHOSPHAT FÜR DIE PHOSPHOFRUKTOKINASE-
UND DIE FRUKTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE-REAKTION

MONIKA SCHINDLER

1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547927_0099

Aus dem Dr. von Haunerschen Kinderspital der
Universität München

Vorstand: Prof. Dr. H.-B. Hadorn

UNTERSUCHUNGEN ZU STÖRUNGEN IM
FRUKTOSESTOFFWECHSEL
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG
DER BEDEUTUNG VON FRUKTOSE-2,6-BISPHOSPHAT
FÜR DIE PHOSPHOFRUKTOKINASE- UND DIE
FRUKTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE-REAKTION

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Monika Schindler

aus
München

Jahr
1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Endres

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H.-B. Hadorn

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Y.S. Shin

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen
Prüfung:

3.6.86

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen
Dank aussprechen

Frau Dr. rer. nat.

YOON S. SHIN

für ihre intensive Betreuung und Hilfe, ohne die
diese Arbeit nicht zustandegekommen wäre

Herrn Prof. Dr.

W. ENDRES

für seine Anregungen zur Thematik und Unterstüt-
zung der Versuche

Herrn

M. RIETH

für seine freundliche Hilfe im labortechnischen
Bereich.

GEWIDMET

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. EINLEITUNG	1
1.1 Fructose, Allgemeines	1
1.1.1 Vorkommen	1
1.1.2 Metabolismus	2
1.1.3 Toxizität	3
1.2 Hereditäre Fructoseintoleranz	7
1.2.1 Enzymdefekt	7
1.2.2 Symptomatik	9
1.2.3 Therapie	11
1.3 Fructose-1,6-Bisphosphatase	11
1.4 Glykogenose Typ VII, Muskel- phosphofruktokinasmangel	14
1.4.1 Symptome, Enzymdefekt, PFK-Forschung	14
1.4.2 Gestörte Glykogenverwertung	18
1.4.3 Effektoren der PFK-Reaktion	19
1.5 Fructose-2,6-Bisphosphat	20
1.5.1 Entdeckung und Eigenschaften	20
1.5.2 F-2,6-P ₂ -Synthese	21
1.5.3 Regulation des Glukosemetabolismus durch F-2,6-P ₂	23
1.6 Ziele und Fragestellungen der vorliegenden Studie	25
2. MATERIAL	27
2.1 Blut- und Gewebeproben	27
2.2 Radioaktive Substanzen und Bio- chemica	27

	<u>Seite</u>
3. METHODEN	29
3.1 Vorbereitung der Proben	29
3.1.1 Leukozytenpräparation	29
3.1.2 Erythrozytenpräparation	29
3.1.3 Sonstige Gewebeproben	30
3.2 Hämoglobininmessung in Erythrozyten	30
3.3 Proteinbestimmung nach Lowry	31
3.4 Herstellung von $^{14}\text{C-F-1-P}$	32
3.4.1 Gewinnung von Fruktokinase aus Rattenleber	32
3.4.2 Messung der Fruktokinaseaktivität durch Herstellung von $^{14}\text{C-F-1-P}$ aus $^{14}\text{C-Fruktose}$	34
3.4.2.1 Testansatz	34
3.4.2.2 Auswertung	35
3.4.3 Synthese von $^{14}\text{C-F-1-P}$ aus $^{14}\text{C-Fruktose}$	37
3.5 Herstellung von $^{14}\text{C-F-6-P}$ als Substrat für die PFK-Reaktion	38
3.6 Bestimmung der Phosphofruktokinaseaktivität in Erythrozyten und Muskelgewebe	40
3.6.1 Testansatz	40
3.6.2 Trennung des Produktes vom Substrat	41
3.6.3 Berechnung der Enzymaktivität	42
3.7 Aktivierung der PFK-Aktivität durch Zusatz von F-2,6-P_2 bzw. Leukozytenextrakt von HFI-Patienten	43

	<u>Seite</u>
3.8 Messung der FB Pase-Aktivität in Leukozyten, Darmmukosa und Lebergewebe	44
3.8.1 Testansatz	45
3.8.2 Auswertung	46
3.9 Hemmung der FB Pase-Aktivität durch Zusatz von verschiedenen Konzentrationen F-2,6-P ₂ bzw. Leukozytenextrakt von HFI-Patienten	46
3.10 F-1-P-Aldolasemessung nach Shin	47
4. ERGEBNISSE	49
4.1 Phosphofruktokinase-messung	49
4.1.1 Normwerte	49
4.1.2 Enzymkinetik	54
4.1.3 PFK-Aktivierung durch F-2,6-P ₂	55
4.1.4 Aktivierung der PFK durch Leukozytenextrakt von HFI-Patienten	56
4.1.5 Überprüfung der Testmethode	58
4.1.6 Messung der F-2,6-P ₂ -Werte in Patientenleukozyten	59
4.2 Fruktose-1,6-Bisphosphatasemessung	62
4.2.1 Ergebnisse und Normalwerte	62
4.2.2 Hemmung der FB Pasereaktion durch F-2,6-P ₂	65
4.2.3 Hemmung der FB Pase-Reaktion durch Leukozytenextrakt von HFI-Patienten	69
4.2.4 Messung des F-2,6-P ₂ -Gehaltes in Leukozytenextrakt von HFI-Patienten	70

	<u>Seite</u>
5. DISKUSSION	73
5.1 Zur Methodik	73
5.2 Zu den Ergebnissen	75
6. ZUSAMMENFASSUNG	79
BIBLIOGRAPHIE	81
LEBENS LAUF	90

1. EINLEITUNG

1.1 Fruktose, Allgemeines

1.1.1 Vorkommen

Die linksdrehende Ketohexose Fruktose stellt eine wichtige Kohlenhydratquelle dar, sowohl als freies Monosaccharid als auch in ihrer Disaccharidform Saccharose, die zu gleichen Teilen aus Fruktose und Glukose besteht. In der westlichen Welt beläuft sich die durchschnittliche tägliche Fruktoseaufnahme auf 50 - 100 g/die mit steigender Tendenz (1).

Fruktose, als natürlicher Bestandteil vieler Pflanzen und fast aller Obst- und Gemüsesorten, kann bis zu 40 % von deren Trockengewicht ausmachen. Die Süßkraft reiner Fruktose liegt bei gleicher Kalorienzahl ca. 1,7 x höher als die von Saccharose, was vermutlich einen Grund für die zunehmende Verwendung im Haushalt darstellt.

Auf dem medizinischen Sektor wird Fruktose als Infusionslösung zur Deckung des Kohlenhydratbedarfs sowohl pur als 'Lävulose' wie auch als 'Invertzucker', nämlich als Saccharoselösung verwendet; beide Anwendungsformen bergen gewisse Risiken für gesunde Individuen und lebensbedrohliche für Patienten mit Fruktosestoffwechselstörungen, auf die später noch eingegangen wird.

Eine weitere Fruktosequelle stellt der Polyalkohol Sorbit dar, der in Gemüse und Obst fast so häufig vorkommt wie Fruktose; desgleichen das Fruktosepolymer Inulin (in Chicoree und Kartoffeln).

1.1.2 Metabolismus

Beim Menschen wird der größte Teil der aufgenommenen Fruktose im Darm unverändert resorbiert (2), wobei die meisten Autoren ein spezifisches D-Fruktose-Transportsystem postulieren (1). Ein carrier-regulierter Diffusionsprozeß wurde ebenso wie ein aktiver Transportmechanismus vorgeschlagen (3-4). Nach Fruktoseaufnahme wird im Pfortaderblut beim Menschen eine Konzentration von ca. 1,5 mM Fruktose erreicht (5), wobei die Plasmakonzentration die Aufnahme und Verstoffwechselung in der Leberzelle bestimmt.

Hier, wie auch zum geringeren Teil in der Dünndarmmukosa und in der Niere, findet der größte Teil des Fruktosemetabolismus statt; hauptsächlich deswegen, weil diese Organe eine spezielle Enzymausstattung dafür besitzen, die Fruktose in Form verschiedener Zwischenprodukte in die Glykolyse bzw. Glukoneogenese einzuschleusen.

Es handelt sich hierbei um Fruktokinase, Leberaldolase Typ B und Triokinase (siehe Abb. 1). Die Substrataffinität vor allem der Fruktokinase ist mit einer K_M von 0,5 mM (6) so hoch, daß dieser Weg der Fruktoseverarbeitung der weitaus wichtigste ist, obwohl noch weitere zur Verfügung stehen.

Die Fruktose wird hierbei durch Fruktokinase unter Spaltung von ATP in Fruktose-1-Phosphat übergeführt. Dabei wurden Maximalgeschwindigkeiten von 2,2 bis 3,1 $\mu\text{mol/min/g}$ Gewebe bei 22⁰ gemessen (2).

Im folgenden spaltet die Leberaldolase das entstandene Fruktose-1-Phosphat in D-Glycerinaldehyd und Dihydroxy-

acetonphosphat. Triokinase katalysiert dann die Phosphorylierung von D-Glycerinaldehyd zu Glycerinaldehyd-3-P, welches Bestandteil der Glykolyse ist.

Die beiden anderen Möglichkeiten, D-Glycerinaldehyd in ein Triosephosphat zu überführen, sind:

- 1) Reduktion zu Glycerin durch NADH, anschließende Phosphorylierung zu Glycerophosphat und Oxidation zu Dihydroxyacetonphosphat.
- 2) Oxydation zu D-Glycerat und Phosphorylierung zu 2-Phosphoglycerat.

Studien über die Verteilungsmuster der Metaboliten (8) deuten darauf hin, daß in vivo der erstgenannte Weg vorherrscht.

In Abwesenheit von Glucose kann Fruktose auch von Hexokinase zu F-6-P phosphoryliert und so in den Glucosestoffwechsel eingeschleust werden, eine Möglichkeit, die aber in der Regel durch die physiologischen Glucosekonzentrationen kaum von Bedeutung ist (9), da die Hexokinaseaffinität zu Glucose um mehrere Zehnerpotenzen diejenige zu Fruktose übersteigt.

1.1.3 Toxizität

Eine Toxizität von Fruktose wurde früher nur für Patienten mit hereditärer Fruktoseintoleranz angenommen, hat sich aber in den 60er Jahren auch für gesunde Individuen

bestätigt, denen hohe Dosen Fruktose i.v. appliziert wurden. Als herausragende Befunde sind Hyperurikämie (10) und, weit gefährlicher, Laktatazidose (11) zu nennen.

Die schnelle Aufnahme und Verstoffwechselung der Fruktose hängt mit der hohen Geschwindigkeit der Fruktokinasereaktion im Vergleich zu den weit langsameren Folgereaktionen zusammen, aufgrund derer sich Fruktose-1-P anstaut, was nur langsam weiterverstoffwechselt wird.

Die von mehreren Autoren bestätigte Hyperurikämie (1) erklärt sich durch den raschen Abfall von anorganischem Phosphat und GTP nach Fruktosebelastung: Der P_i -Spiegel sinkt, weil P_i zur Rephosphorylierung des bei der Fruktokinasereaktion verbrauchten ATP benötigt wird; GTP kann wie ATP die Phosphatgruppe für die Triokinasereaktion zur Verfügung stellen, seine Konzentrationserniedrigung also daher rühren (12).

Sowohl P_i wie auch GTP gehören zu den stärksten Hemmstoffen der AMP-Deaminase. Diese ist bei physiologischen Effektorkonzentrationen zu ca. 95 % gehemmt, nicht aber nach der fruktoseinduzierten Konzentrationsänderung der Adeninnukleotide, und leitet so den Abbau von AMP bis hin zu Urat ein.

Die zweite Gefahr hoher intravenöser Fruktosezufuhr, die Laktatazidose, leitet sich folgendermaßen her (13-14):

- 1) Der Fruktosemetabolismus umgeht die Phosphofruktokinasereaktion, den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glykolyse, und

- 2) das bei der Fruktokinase-reaktion anfallende F-1-P stimuliert die Pyruvatkinase, was ebenfalls die Laktatazidose begünstigt (15).

Aus den genannten Gründen ist Fruktose ein ungenügender Ersatz für Glukose bei der parenteralen Ernährung und bei bekannter Fruktosestoffwechselstörung sowie bei Leberkrankheiten, Diabetes mellitus und Glykogenose Typ I kontraindiziert.

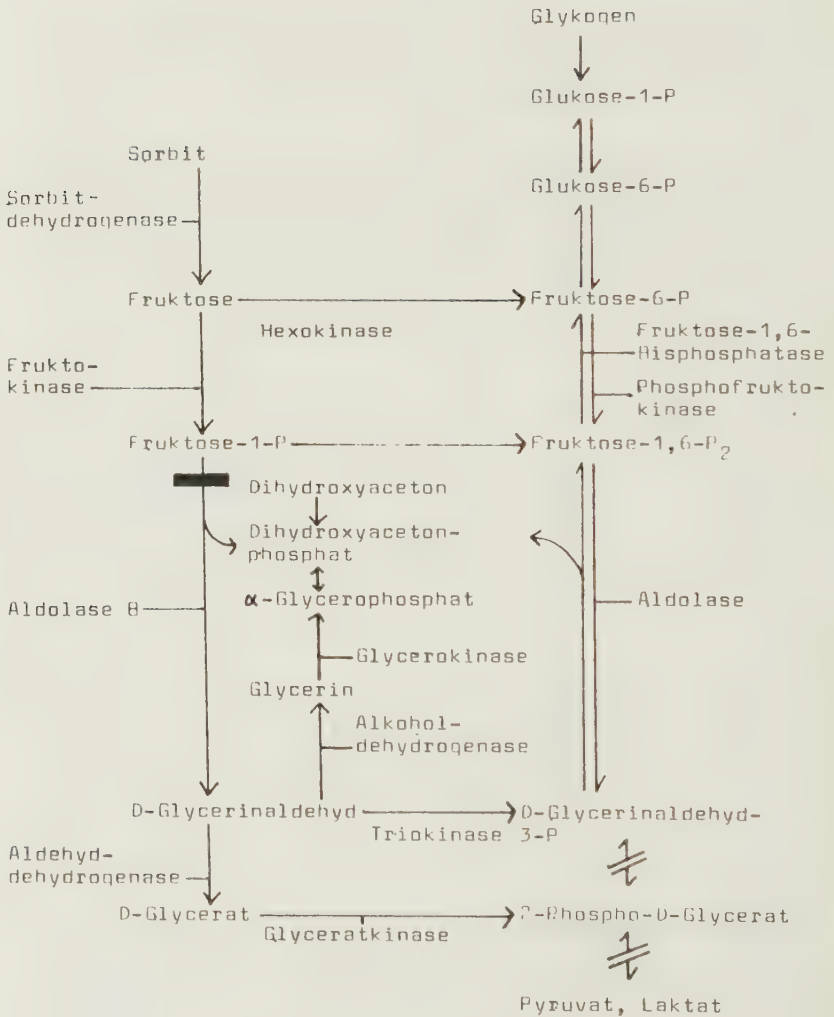


Abb. 1: Fruktosestoffwechsel (nach 16)

■ : Enzymdefekt bei HFI

1.2 Hereditäre Fruktoseintoleranz

1.2.1 Enzymdefekt

Bei der im Jahre 1955 von Chambers und Pratt erstmalig beschriebenen Hereditären Fruktoseintoleranz (17) handelt es sich um eine Krankheit mit autosomal rezessivem Erbgang. Bei den Patienten fehlt das Enzym Aldolase B oder ist in seiner Aktivität auf 10 - 15 % der Norm reduziert. Aldolase B katalysiert in Leber, Niere und Dünndarm die Reaktion



und bei ihrem Fehlen ist somit die Verarbeitung von Fruktose zu Glukose sowie das Einschleusen der Fruktose in die Glykolyse blockiert.

In Säugergeweben sind drei verschiedene Typen von Aldolasen beschrieben (18), alle drei tetramerische Isoenzyme, die mit unterschiedlicher Substratspezifität Fruktose-1,6- P_2 und Fruktose-1-P spalten:

Aldolase A, vorherrschend in Muskelgewebe. Sie stellt auch die fetale Form der späteren Leberaldolase B dar und ist bei Patienten mit undifferenzierten Leberzellcarzinomen erhöht (18). Ihr Aktivitätsbruch Spaltung F-1,6- P_2 / Spaltung F-1-P beträgt 50 - 100 (19).

Leberaldolase B, die mit 98 % den größten Anteil der adulten Fruktaldolasen bildet. Ihr Aktivitätsbruch $F-1,6-P_2/F-1-P$ beträgt 0,9 - 1,5, und Aldolase B ist somit die einzige Aldolase, die bevorzugt F-1-P spaltet;

Aldolase C, auch "brain type aldolase" genannt (18); Aktivitätsbruch $F-1,6-P_2/F-1-P$ ist 10 - 50.

Charakteristisch für HFI-Patienten ist aufgrund des Aldolase B-Mangels ein Ansteigen des Bruchwertes Spaltung $F-1,6-P_2/$ Spaltung F-1-P, dessen Normbereich in Hepatozyten um 1,1 liegt, auf Werte größer 2 (18).

Der beschriebene Enzymdefekt zieht, auch schon nach Aufnahme geringer Fruktosemengen, Akkumulationen von F-1-P in Leber, Niere und Dünndarm nach sich. Dieses ist nun durch verschiedene Wirkmechanismen für das Hauptsymptom Hypoglykämie wie auch für einige andere Befunde verantwortlich.

Die ernste und schlimmstenfalls bis zu Koma und Exitus führende Hypoglykämie resultiert aus einer verminderten Glukosefreisetzung aus der Leber nach Fruktosezufuhr. Dabei wurde eine gestörte Glukoneogenese festgestellt, da die Hypoglykämie nicht durch Zufuhr von Dihydroxyaceton behoben werden kann (1). Eine direkte Hemmung der glukoneogenetischen Enzyme G-6-P-Isomerase und der Aldolase in Richtung Triosenkondensation durch Fruktose-1-P wird beschrieben (20).

Auch der durch die Fruktokinasereaktion bedingte ATP-Abfall mag die erniedrigte Glukoneogeneserate begünstigen.

Ebenso blockiert ist bei der fruktoseinduzierten Hypoglykämie die Glykogenolyse, und zwar auf der Stufe der Phosphorylase a, die durch F-1-P kompetitiv gehemmt wird; ein Effekt, den der oben beschriebene Abfall des anorganischen Phosphats noch verstärkt (21).

1.2.2 Symptomatik

Die "Vergiftungssymptomatik" bei HFI-Patienten läßt sich größtenteils aus den genannten Stoffwechselvorgängen herleiten; sie tritt nur nach Fruktosezufuhr auf, das heißt bei gestillten Säuglingen erstmals bei Umstellung auf saccharose- oder fruktosehaltige Nahrung. Mangelnder Appetit, Erbrechen und Gedeihstörungen stellen die unspezifischen Hauptsymptome bei ständiger Fruktosezufuhr dar, akut nach jeder fruktosehaltigen Mahlzeit können Schwitzen, Zittern, Übelkeit bis zum Erbrechen, Verwirrtheit und Krämpfe auftreten (siehe Tabelle 1).

Die Kinder entwickeln eine starke Abneigung gegen alle fruktosehaltigen Lebensmittel, z.B. auch gegen fruktosegesüßte Bonbons, nicht aber gegen glukosehaltige.

Die Fruktosetoleranz wächst aus ungeklärten Gründen mit zunehmendem Alter, so daß ältere Kinder und Erwachsene geringere Fruktosemengen komplikationslos zu sich nehmen können; da sie das schädliche Agens ohnehin meiden, geraten sie wesentlich seltener in akut bedrohliche Situationen. Eine Ausnahme stellen die bereits erwähnten Sorbit- und Saccharose-Infusionen dar, die gelegentlich postoperativ verabreicht werden.

Tab. 1 (1): Symptome bei hereditärer Fruktoseintoleranz

<u>Akute Belastung</u>	<u>Chronische Belastung</u>
Schwitzen	Appetitlosigkeit, Erbrechen
Zittern	Gedeihstörungen
Benommenheit	Reizbarkeit
Übelkeit	Müdigkeit, Apathie
Erbrechen	Ikterus
Apathie, Lethargie, Koma	Hepatomegalie
Krämpfe	Hämorrhagien
	Durchfall
	Tremor, Zuckungen
	Ödeme, Aszites
	Wachstumsverzögerungen

Im weiteren: Protrahierte Fibrose, Zirrhose der Leber
 Abneigung gegen Süßigkeiten und besondere
 Eßgewohnheiten;
 keine Karies

Bei stark betroffenen Säuglingen und Kleinkindern werden als zusätzliche klinische Befunde Hepatomegalie, Blässe, Blutungen in Form von Meläna, Hämatemesis, Suffusionen, außerdem Ikterus, Ödeme, Tachypnoe, Aszites, Oligurie oder Anurie als Schockzeichen beschrieben (18).

Als auffälligste Laborbefunde und Parameter für den Grad der Leberfunktionsschädigung sind zu nennen:

- Erniedrigte Serumkonzentration von Gerinnungsfaktoren
- erhöhte Leberenzyme i.S.
- Hypoproteinämie.

1.2.3 Therapie

Die Therapie besteht lediglich in der Vermeidung saccharose- und fruktosehaltiger Nahrungsmittel. Unter dieser Diät sind die Patienten völlig beschwerdefrei, und Leber- und Nierenfunktion erholen sich in der Regel innerhalb einiger Wochen.

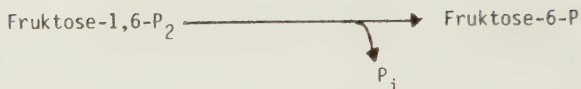
1.3 Fruktose-1,6-Bisphosphatase

Bei unseren Untersuchungen in Leukozyten und Darmmukosa fanden wir die FBPase-Aktivität bei HFI-Patienten erniedrigt, weswegen in dieser Studie besonderes Augenmerk auf die FBPase-Reaktion gelegt wird.

Im Vergleich zu einer früheren Studie von Gitzelmann et al (1), die FBPase-Aktivität in Hepatozyten mit 2,73 - 4,98 IU/Gramm Biopsiegewebe sowohl bei HFI-Patienten als auch bei einer gesunden Kontrollgruppe angibt, war in unseren Testreihen die FBPase-Aktivität in den Leukozyten junger Säuglinge mit HFI auf ca. 20 % der Norm erniedrigt.

Diesen Befund näher zu untersuchen und mit einer eventuellen Hemmung durch Fruktose-2,6- P_2 bei HFI in Zusammenhang zu bringen, ist unter anderem Ziel dieser Arbeit.

Die Fruktose-1,6-Bisphosphatase katalysiert in der Glukoneogenese die Reaktion



Diese findet aus thermodynamischen Gründen nur in der angegebenen Richtung statt und stellt somit einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glukoneogenese dar (weiterhin sind hier die Bildung von Phosphoenolpyruvat aus Pyruvat und die Bildung von Glukose aus G-6-P zu nennen).

In ihrer Darstellung einer neuen Anreicherungsmethode für das Enzym beschreiben Meek und Nimmo (22) die FBPase als ein homogenes tetramerisches Enzym, dessen Untereinheiten je ein Molekulargewicht von ca. 40000 - 41000 aufweisen.

Schon seit langem ist die FBPase als wichtiges Kontrollenzym für den Kohlenhydratmetabolismus der Leber bekannt, das auf vielfältige Weise in seiner Aktivität und Substrataffinität beeinflusst werden kann. So wird beispielsweise durch Corticosteroide wie auch durch Trijodthyronin die FBPase-Aktivität im Dünndarm supprimiert, in der Leber jedoch gesteigert (23), was auf die unterschiedliche Bedeutung des Enzyms in verschiedenen Geweben hindeutet.

Die bekanntesten und daher am gründlichsten untersuchten Effektoren jedoch sind Fructose-2,6-P₂ (siehe auch 1.4) und AMP, im weiteren Mg²⁺ (24 - 27).

Bei Hemmung des Enzyms durch steigende F-2,6-P₂-Konzentrationen beschreiben van Schaftingen und Hers (28) eine Änderung der Substratsättigungskurve von hyperbolisch

nach sigmoid; außerdem weisen sie auf die relativ stärkere Hemmung im Bereich niedriger Substratkonzentrationen ($0 - 50 \mu\text{M F-1,6-P}_2$) hin.

In Gegenwart von AMP, dem am längsten bekannten Inhibitor der FBPase-Reaktion (29), ergänzen sich dessen Effekte mit denen des F-2,6-P_2 synergistisch.

Meek und Nimmo postulieren aufgrund ihrer Studien zur Bindungskinetik (30) ein Drei-Stadien-Modell zur Darstellung der allosterischen Möglichkeiten der FBPase. In ihren Untersuchungen beschreiben sie die FBPase-Hemmung durch AMP in Abwesenheit von F-2,6-P_2 als unkompetitiv bezüglich des Substrats F-1,6-P_2 und nicht kompetitiv in seiner Gegenwart; das heißt, daß im ersten Fall AMP nur an den Enzymsubstratkomplex bindet, im letzteren zusätzlich an das freie Enzym. AMP ist also nur in Anwesenheit eines der beiden Fruktosebisphosphate fähig, an die FBPase zu binden, und zwar mit je 2 Molekülen pro Tetramer.

Das Enzymmodell wird als Drei-Stadien-Modell beschrieben, in dem F-2,6-P_2 sowohl an die katalytische als auch an die allosterische Seite binden kann, AMP jedoch nur, wenn die katalytische Seite besetzt ist.

Daß F-2,6-P_2 die FBPase bei unphysiologisch hoher Substratkonzentration auch aktivieren kann, spricht nach Corredor et al (31) für einen allosterischen Effekt, worin sie mit Meek und Nimmo übereinstimmen.

Mizunuma und Tashima (32) bestätigen wie auch andere Autoren die genannte Potenzierung der AMP-induzierten FBPase-

Hemmung durch F-2,6-P₂. Sie beschreiben eine Minderung der FBPase-Sensitivität gegenüber dieser Hemmung bei Anwesenheit von Mn²⁺ statt Mg²⁺ als aktivierendem Kation.

Die FBPase-Hemmung durch F-2,6-P₂ spielt möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Stimulierung der Glukoneogenese durch Glukagon, welches bekanntermaßen die F-2,6-P₂-Konzentration in der Leber erniedrigt (siehe 1.4). Ebenfalls denkbar und Teil dieser Untersuchung ist es, die erniedrigte FBPase-Aktivität bei HFI auf akkumuliertes F-2,6-P₂ zurückzuführen (siehe 3.2 und 3.3).

1.4 Glykogenose Typ VII, Muskelphosphofruktokinase-mangel

1.4.1 Symptome, Enzymdefekt und PFK-Forschung

Als erste beschrieben Tarui und Mitarbeiter 1965 eine neue Form von Glykogenspeicherkrankheit an drei Mitgliedern einer Familie: Den Muskelphosphofruktokinase-mangel, 'Tarui's disease' (33).

Die Patienten beklagten sich alle über leichte Ermüdbarkeit, Schwäche der Skelettmuskulatur und die Unfähigkeit mit anderen Schritt zu halten; diese Symptome existierten in relativ unveränderter Stärke seit ihrer Kindheit. Nach Ausschluß neurologischer Störungen wurden bei Untersuchungen der Glykolysekette folgende Befunde erhoben:

Die Muskel-PFK-Aktivität war in allen Fällen auf 1 - 3 %

der Norm reduziert, im Ischämietest stieg das venöse Laktat nicht an, und eine beträchtliche Anhäufung von Hexosemonophosphaten wurde festgestellt; ebenfalls eine mäßige Steigerung des Muskelglykogens von normalerweise unter 1,5 g/Gramm Frischmuskelgewebe auf über 2 g (34).

Die PFK-Aktivität in Erythrozyten war ebenfalls in allen Fällen auf ca. 50 % der Norm erniedrigt (35), was schon damals zu der Vermutung Anlaß gab, ein Enzym mit mindestens zwei Untereinheiten zu untersuchen.

Im weiteren Verlauf seiner Studien stellten Tarui et al (35) bei den Patienten mit dieser wahrscheinlich autosomal rezessiv vererbten Störung eine verminderte Erythrozytenüberlebenszeit von 13 - 16 Tagen fest, erythroide Hyperplasie des Knochenmarks und - der Hämolyse entsprechend - erhöhte Retikulozytenwerte von 3,8 - 6,5 %.

Als Leitsymptome des Muskel-PFK-Mangels nannten sie daher Myopathie und mäßige Hämolyse. Ihre Folgerung, daß normale Erythrozyten-PFK ein heterogenes Enzym sei, dessen Aktivität zu ca. 50 % der 'Muskel-PFK-Untereinheit' zu verdanken ist, unterstützten sie durch Neutralisationstests mit Anti-Skelettmuskel-PFK-Serum vom Kaninchen, die ca. die Hälfte der PFK-Aktivität in menschlichen Erythrozyten neutralisierten.

Taruis Hypothese wird durch die jüngere Forschung von anderen Autoren (36) zwar nicht widerlegt, muß aber doch erweitert werden:

1979 postulieren Kahn et al (37) aufgrund ihrer Gelelektrophoreseuntersuchungen drei verschiedene PFK-Isoenzyme.

- 1) Muskel-Typ PFK ist die einzige in adultem Skelettmuskel vorhandene Form, und kommt vor in den Enzymen für Herz, Hirn, Erythrozyten und Hoden.
- 2) Fibroblasten-PFK wird hauptsächlich in Plazenta, Fibroblasten, Niere und einigen malignen Geweben gefunden.
- 3) Leber-Typ PFK scheint die absolut vorherrschende Form in Leber, Thrombozyten und polymorphkernigen Zellen zu sein.

Erst im Jahre 1980 erfolgte die Aufklärung des strukturellen Enzymmusters durch Vora et al (38):

Ihnen gelang es, die normale Erythrozyten-PFK als eine heterogene Mischung von fünf Isoenzymen zu zeigen, bestehend aus M-(=Muskel) und L-(=Leber)Einheiten.

Die Isoenzyme stellen alle möglichen Verbindungen der beiden Untereinheiten zu einem Tetramer dar, nämlich L_4 , L_3M , L_2M_2 , LM_3 und M_4 .

Vora et al:

"Im Chromatogramm ... stellt sich die Patienten-Erythrozyten-PFK als ein einziger Peak in der Position des Leberenzym dar. Die vier Isoenzyme, die Muskel-PFK enthalten, fehlten völlig" (38).

Die Patienten-Leukozyten-PFK besteht vorherrschend aus L_4 -Isoenzym, wie auch diejenige gesunder Individuen; diese Beobachtung steht in Einklang mit früheren Messun-

gen, die für Patienten mit 'Tarui's disease' normale Leukozyten-PFK-Werte ermittelten.

Als bisher einzige Autoren berichten Guibaud et al (34) über zwei PFK-Mangel-Patienten mit überhaupt nicht bzw. minimal erniedrigter Erythrozyten-PFK: Es handelt sich dabei um zwei Geschwister mit so starker Muskelhypotonie, daß das eine Kind im Alter von sechs Monaten an respiratorischer Insuffizienz verstarb, das andere im Alter von 14 Monaten noch nicht ohne Hilfe sitzen konnte. Die durch den früh erkannten Muskel-PFK-Mangel ausgelöste Hypotonie wurde in beiden Fällen durch starke Gelenksteifigkeit verschlimmert.

Eine eventuelle Kompensation der ausgefallenen Muskeltyp-PFK in den Erythrozyten durch andere PFK-Untereinheiten ist in Erwägung zu ziehen, steht aber in Widerspruch zu dem extremen Skelettmuskelbefund.

Normbereiche für PFK-Aktivität:

Tarui und Mitarbeiter maßen bei gesunden Probanden in Erythrozytenkonzentrat PFK-Aktivitäten von $1,37 \pm 0,4$ μmol Substratumsatz/min/ml Extrakt (33). In neueren Untersuchungen von Vora et al werden Normaktivitäten von ca. $14,5 \mu\text{mol}$ Substratumsatz/min/g Hb bei 37° angegeben (38).

In Skelettmuskelgewebe von Kontrollpersonen fanden Guibaud et al (34) einen Substratumsatz von $7,6 - 36,2 \text{ U/g}$ Frischmuskelgewebe; Okuno nennt $0,19 \pm 0,03 \mu\text{mol}$ Substratumsatz/mg Protein/min (39); siehe auch unsere Messungen unter 4.1.

Wie bereits erwähnt, finden sich in Skelettmuskelgewebe von Glykogenose VII-Patienten auf 1-3 % der Norm reduzierte Werte, in Erythrozyten auf 50 % reduzierte, während die PFK-Aktivität in Fibroblasten sowie Leukozyten der von gesunden Vergleichspersonen entspricht.

1.4.2 Gestörte Glykogenverwertung

'Tarui's disease', die Glykogenspeicherkrankheit VII, ist durch mäßige Ablagerungen normal verzweigten Glykogens im Skelettmuskel gekennzeichnet.

Dieser Befund läßt sich teilweise durch die mangels Glykolyse sich anstauenden Hexosemonophosphate und eine daraus resultierende gesteigerte Glykogensynthese erklären.

Dem widerspricht die Beobachtung, daß ein Regulationsmechanismus zu existieren scheint, der die unbegrenzte Akkumulation von Glykogen verhindert (39); als Kontrollenzyme nimmt man bei der Glykogensynthese vor allem die Glykogensynthetase und die UDPG-Pyrophosphorylase an, beim Glykogenabbau die Phosphorylase.

Bei Patienten mit PFK-Mangel ergab sich normale Muskelphosphorylase-Aktivität, jedoch auf das doppelte bzw. dreifache der Norm erhöhte Glycogensynthetase- und UDPG-Pyrophosphorylasewerte.

Daß die Glykogensynthetase im menschlichen Skelettmuskel fast ausschließlich in ihrer G-6-P-abhängigen Form vorhanden ist, wurde durch Kontrollgruppen bestätigt (40).

Bei Glykogenose VII-Patienten jedoch fand sich ein erhöhter Anteil an G-6-P-unabhängiger Glykogensynthetase-Aktivität, der vermutlich zum Teil auf den ständig hohen G-6-P-Spiegel in diesem Gewebe zurückzuführen ist. Wie aber die für die G-6-P-Aktivierung nötige K_M ($7 \times 10^{-4} \text{ m}$) der Patienten beweist, kann diese erhöhte G-6-P-Konzentration nicht vollends verantwortlich für die Aktivitätssteigerung sein (39).

Im Falle einer Glykogenolysestörung steigt der Glykogengehalt ebenfalls an, auch wenn die Syntheserate normal bleibt. Allerdings erniedrigen dann die Enzyme der Glykogensynthesekette zwecks Erhaltung der Homöostase ihre Aktivität (speziell die Glykogensynthetase als Schrittmacherreaktion), um den Glykogengehalt innerhalb eines gewissen Bereichs zu halten.

Daß bei den PFK-Mangel-Patienten die Aktivitäten sowohl der Glykogensynthetase als auch der UDPG-Pyrophosphorylase erhöht sind, weist nach Okuno darauf hin, daß hier zwei biochemische Störungen vorliegen: Nicht nur der Defekt in der Glykolyse, sondern auch eine pathologisch erhöhte Glykogensyntheserate (39).

1.4.3 Effektoren der Phosphofruktokinase-reaktion

PFK ist als Schrittmacher-Enzym der Glykolyse Substrat für komplexe allosterische Regulationsvorgänge durch zahlreiche Metaboliten, von denen als wichtigste zu nennen sind: F-1,6- P_2 , F-2,6- P_2 mit der größten Affinität zum allosterischen Bindungszentrum (41), ATP, AMP, Zitrat,

NH_4^+ sowie Ca^{2+} (42) und anorganisches Phosphat (43).

Als stärkste und für uns interessanteste Aktivatoren gelten F-2,6- P_2 und AMP. Beide steigern in mikromolaren, das heißt physiologischen Konzentrationen die Maximalaktivität des Enzyms, F-2,6- P_2 jedoch wesentlich stärker als AMP (44). In Abwesenheit von AMP ist der Aktivierungseffekt von F-2,6- P_2 nicht meßbar (45).

Den wirksamen Mechanismus für F-2,6- P_2 stellt nach van Schaftingen und Hue (45) eine Affinitätserhöhung des Enzyms zu seinem Substrat F-6-P dar, sowie eine Aufhebung der physiologisch vorhandenen Hemmung durch ATP.

Diese Ergebnisse stehen in keinem Widerspruch zu der Hypothese anderer Autoren (41, 46), die ein einziges allosterisches Bindungszentrum ans Enzym für alle positiven wie auch negativen Effektoren voraussetzt. Der wirksame Effektor ist der mit der größten Affinität zu diesem Bindungszentrum beim entsprechenden pH und der jeweiligen Substratkonzentration.

1.5 Fruktose-2,6-Bisphosphat

1.5.1 Entdeckung und Eigenschaften

1979 wurde von van Schaftingen et al die Existenz eines niedermolekularen säurelabilen Effektors der PFK-Reaktion entdeckt (47), der diese in physiologischen, das heißt mikromolekularen Konzentrationen sehr stark aktiviert und in molaren Konzentration hemmt (48).

Durch eingehende Untersuchungen der biochemischen Eigenschaften konnte dieser 'Aktivierungsfaktor' ein Jahr später eindeutig als F-2,6-P₂ identifiziert werden. Das wurde auch von anderen Untersuchern bestätigt (49), denen es gelang, gleichzeitig den physiologischen Syntheseweg für F-2,6-P₂, nämlich die ATP-verbrauchende Phosphorylierung von F-6-P, zu finden.

Die Hypothese bestätigte sich, daß F-2,6-P₂, welches in Hepatozyten in so geringen Konzentrationen wie 0,1 - 11 µm vorliegt (50), den potentesten Regulator für den Glukoseauf- und abbau darstellt.

In Rattenhepatozyten ergaben sich bei anderen Untersuchern F-2,6-P₂-Konzentrationen von 1-9 nmol/g Lebergewebe (32) und, übereinstimmend, $3,5 \pm 0,2$ nmol/g Zellen (51).

Hue beobachtete bei Untersuchungen mit Ratten aufsteigende F-2,6-P₂-Konzentrationen in Nebenhodengewebe, Niere, Skelettmuskel, Lunge, Herz, Leber, Hirn zwischen 0,1 und 2,3 nmol/g Gewebe (50, bestätigt von 52 und 53), wobei zu erwähnen ist, daß die F-2,6-P₂-Konzentrationen durch zahlreiche Metabolite um ein Vielfaches erhöht bzw. vermindert werden können; eine Tatsache, die ich im weiteren etwas näher erläutern möchte.

1.5.2 F-2,6-P₂-Synthese

Die Konzentration an physiologisch vorhandenem F-2,6-P₂ wird von dem bivalenten Enzym Fruktose-6-P, 2-kinase/

Fruktose-2,6-Bisphosphatase reguliert (siehe Abb. 2), welches nur in seiner dephosphorylierten Form aktiv ist. Die Phosphorylierung, das heißt Inaktivierung, erfolgt durch eine cyclo-AMP-abhängige Proteinkinase, und damit läßt sich auch die Abhängigkeit der F-2,6-P₂-Konzentration vom Glukagonspiegel erklären (siehe auch 1.5.3).

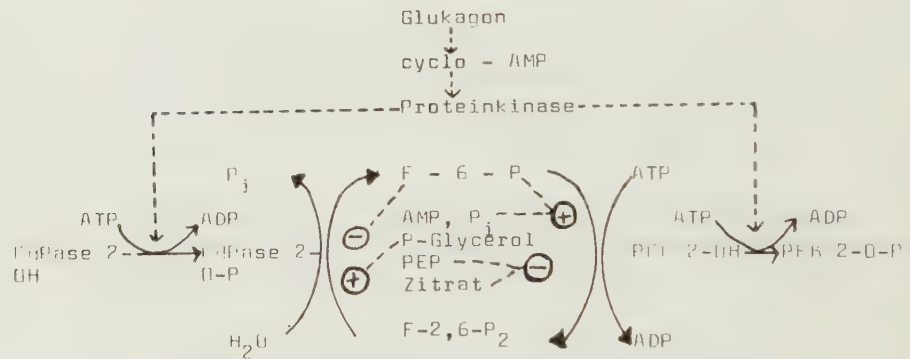


Abb. 2: (nach Hers und van Schaftingen (53)).

Biosynthese und Abbau von F-2,6-P₂ in der Leber unter der Kontrolle von Glukagon und der Einwirkung verschiedener Metabolite

PFK 2/FBPase 2, wie das bivalente Enzym auch genannt wird, zeigt keine Reaktion mit F-1,6-P₂ als Substrat (51). Nach milder Proteolyse sinkt die Kinase-Aktivität, wobei die Bisphosphatase-Aktivität noch relativ lange erhalten bleibt (52), weswegen einige Autoren (54 - 56) zwei verschiedene katalytische Zentren für die Reaktionen in die beiden entgegengesetzten Richtungen postulieren.

1.5.3 Regulation des Glukosemetabolismus durch F-2,6-P₂

Von herausragendem Interesse für die Bedeutung der F-2,6-P₂-Spiegel ist ihre Regulierbarkeit, besonders die Konzentrationssteigerung durch Glukose, Inulin, Vasopressin sowie Phenylephrin und die eindeutige Konzentrationsminderung durch Glukagon.

Dabei läßt sich ein direkter Zusammenhang der F-2,6-P₂-Werte mit dem jeweiligen Glykogenspiegel herstellen, und dadurch auch der vermeintliche Widerspruch einer 'Substrathemmung' der FBPase-Reaktion durch F-2,6-P₂ aufklären.

Dieser Widerspruch existiert überhaupt nur, wenn man F-2,6-P₂ in seiner biochemischen Wirkweise quasi als Analogon von F-1,6-P₂ betrachtet, was bei Kenntnis der Regulation durch das substratspezifische Enzym PFK 2/ FBPase 2 unhaltbar ist.

Kuwajima und Newgard berichten (48), daß der F-2,6-P₂-Spiegel in Rattenlebergewebe nach Glukosezufuhr zwar auf das 10-14-Fache seines ursprünglichen Wertes ansteigt, aber erst nach einem Zeitintervall von 4-5 Stunden bzw. nach Wiederauffüllung der teilweise entleerten Leberglykogenspeicher bis über 35 mg Glykogen/g Lebergewebe. Da der größte Teil des Leberglykogens, das nach einer Fastenperiode gespeichert wird, aus G-6-P via Gluconeogenese synthetisiert wird (57), dürfte dies eigentlich nicht mit einem hohen F-2,6-P₂-Gehalt einhergehen, der ja den Kohlenstofffluß von F-1,6-P₂ zu F-6-P unterdrückt.

Die Beobachtung, daß der deutliche Anstieg von F-2,6-P₂

erst nach Wiederauffüllung der Leberglykogenspeicher und damit nach Wiedereinsetzen der Glykogenolyse stattfindet, erklärt dieses scheinbare Paradoxon.

Auch van Schaftingen et al beschreiben den eindeutigen Zusammenhang zwischen Anstieg der F-2,6-P₂-Spiegel und Glykogenolyse (47), da durch letztere das Substrat für die PFK 2-Reaktion, nämlich F-6-P entsteht.

Auf genau diesem Mechanismus basiert auch die Wirkung von Vasopressin und Phenylephrin, welche beide über eine Stimulation der Glykogenolyse eine Substratanhäufung in Form von Hexosemonophosphaten und damit einen erhöhten Umsatz zu F-2,6-P₂ bewirken (51).

Dafür spricht auch die Tatsache, daß die beschriebene F-2,6-P₂-Erhöhung im Versuch sofort nur bei gut gefütterten Ratten zu erzielen war, nicht jedoch bei Ratten, deren Leberglykogenspeicher durch langes Fasten entleert waren (53); auf diese Weise stimuliert also ein erhöhtes Glukoseangebot via F-2,6-P₂-Erhöhung und damit verbundene PFK-Aktivierung die Glykolyse bzw. vermindert durch F-2,6-P₂-vermittelte FBPase-Hemmung die Glukoneogenese.

Dementsprechend bewirkt Insulin durch Steigerung der Glykolyserate einen erhöhten Anfall von F-6-P und damit ebenfalls eine Steigerung der F-2,6-P₂-Produktion (57).

Im Falle von Glukagon, das ja wie Vasopressin und Phenylephrin eine Erhöhung der Glykogenolyserate und damit der Hexosemonophosphatkonzentration bewirkt, kommt aber noch ein anderer Mechanismus zum Tragen, welcher letztlich den Abfall des F-2,6-P₂-Spiegels hervorruft (51, 53):

2. Aktivierung der PFK-Reaktion durch verschiedene Konzentrationen von F-2,6-P₂ und durch Extrakt aus HFI-Patientenleukozyten.
3. Fruktose-1,6-Bisphosphatasemessung in Leukozyten, Darmmukosa und Lebergewebe bei gesunden Probanden und HFI-Patienten.
4. Hemmung der FBPase-Reaktion in Leukozyten und Lebergewebe durch synthetisches F-2,6-P₂ und durch Leukozytenextrakt von HFI-Patienten.

In Erweiterung der Punkte 2. und 4. und zur Klärung der Frage, ob im Blut von HFI-Patienten eine Hemmung der FBPase-Reaktion durch eventuell angestautes F-2,6-P₂ vorliegt:

5. Methode zur Messung des F-2,6-P₂-Gehaltes in Leukozyten durch den Grad der Aktivierung bzw. Hemmung von PFK- und FBPase-Reaktion.

2. MATERIAL

2.1 Blut- und Gewebeproben

Die Blutproben gesunder Kontrollpersonen stammen größtenteils von Mitarbeitern des Stoffwechsellabors des Dr. von Haunerschen Kinderspitals und von ambulanten Patienten im Alter unter 18 Jahren, bei denen keine Stoffwechselstörung bekannt war, die in einer Verfälschung der Meßwerte hätte resultieren können.

Muskel- und Lebergewebe von Ratten erhielten wir aus dem Tierstall der Haunerschen Kinderklinik.

Die Blut- und Gewebeproben von HFI-Patienten stammen von Patienten, die in der Stoffwechselabteilung der Haunerschen Kinderklinik betreut werden.

2.2 Radioaktive Substanzen und Biochemica

Amershan Buchler, Braunschweig, lieferte die radioaktiven Verbindungen ^{14}C -Fruktose und ^{14}C -Glukose.

Von Sigma Chemie, München, stammen die meisten Enzyme und Substrate:

Hexokinase, Glukose-6-P-Dehydrogenase, NADH, 6-P-Glukose-isomerase, NADP, ATP, F-2,6-P₂, Fruktose-6-P-Kinase.

Zur Diagnostik der hereditären Fruktoseintoleranz wurde zusätzlich die F-1-P-Aldolase gemessen, und zwar mit-

tels radioaktiver Ionenaustausch-Säulenchromatographie nach Shin et al (59); das dazu nötige Substrat ^{14}C -F-1-P wurde selbst hergestellt, ebenfalls das für die PFK-Messung nötige ^{14}C -F-6-P (siehe 3.1).

3. METHODEN

3.1 Vorbereitung der Proben

3.1.1 Leukozytenpräparation

5 ml Vollblut werden mit 1 ml Leukozytenlösung versetzt (Leuko-Lösung: 5 g Dextran, 0,7 g NaCl, 50 mg Heparin auf 100 ml Aqua dest.) und 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Leukozyten befinden sich im Überstand des resultierenden Sediments und werden zur Weiterverarbeitung vorsichtig abgehoben, anschließend in Eppendorfhütchen umgefüllt und 5 min zentrifugiert.

Jetzt befinden sich die Leukos im Sediment und der Plasmaüberstand wird verworfen, während das Sediment 2 x gereinigt wird: Mit 60 µl 0,1 % Essigsäure 30 Sekunden lang verrühren und auf dem Rüttler durchmischen, danach sofort mit 0,7 % NaCl auffüllen und wiederum zentrifugieren.

Sind die Leukozyten im Sediment nach mehrmaligem Waschen von Erythrozyten gereinigt, kann man sie bis zur Verwendung einfrieren; nach dem Auftauen werden sie in 0,150 mM KCl vorsichtig sonifiziert.

3.1.2 Erythrozytenpräparation

Die heparinisierten Vollblutproben werden zentrifugiert und das Plasma von den sedimentierten Erythrozyten abpipettiert. Zwei- bis dreimaliges Waschen der Erys mit 0,9 % NaCl-Lösung und anschließendes Zentrifugieren reichen in der Regel zur Reinigung aus.

Die verbleibenden Erythrozyten werden bis zu ihrer Verarbeitung bei -20°C eingefroren; bei sofortiger Weiterverarbeitung genügt ein kurzes Einfrieren zur Zerstörung der Zellwände. Wie auch bei Leukozyten verfälscht wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren die gemessenen Enzymaktivitäten in Richtung niedrigerer Werte, besonders bei instabilen oder membrangebundenen Enzymen wie Phosphofruktokinase.

3.1.3 Sonstige Gewebeproben

Leber- und Darmbiopsiegewebe wurde unmittelbar nach Entnahme eingefroren und erst direkt vor der Verwendung aufbereitet. Dabei wurden entsprechende Mengen (0,5 - 2 mg) in dem für den jeweiligen Testansatz vorbereiteten Puffer sonifiziert; bei erforderlicher Proteinmessung aus derselben Probe wurde zuerst in einer geringen Menge 0,15 mM KCl sonifiziert und für die Proteinmessung mit KCL, für die enzymatische Messung aber mit entsprechendem Puffer weiterverdünnt.

3.2 Hämoglobinmessung in Erythrozyten

5 μl des entsprechend verdünnten (ca. 1:5) Erythrozytenkonzentrats werden mit 2,5 ml Transformationslösung vermischt und ca. 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Danach wird die Extinktion photometrisch bei einer Wel-

lenlänge von 546 nm gemessen und anschließend analog der Verdünnung rückgerechnet (z.B. $\times 5$); mit dem Umrechnungsfaktor 36,8 multipliziert, ergeben sich dann die Werte in g % Hb.

3.3 Proteinbestimmung nach Lowry (61)

Lösungen: A = 2 % Na_2CO_3 in n/10 NaOH
 B_a = 5,5 g CuSO_4 / 100 ml
 B_b = 1,35 g Seignettesalz / 100 ml Na/K-Tartrat
 Folin - Ciocalteus Phenolreagens
 2 % Na_2CO_3 (für 1:2 Verdünnung Folin)

Mischungen, die immer frisch angesetzt werden müssen:

B, bestehend aus 0,2 ml B_b + 0,02 ml B_a;

C, bestehend aus 5,0 ml A + 0,1 ml B.

Die Eichgerade wird anhand der Proteinmessung aus Rinderserumalbumin in verschiedenen Verdünnungen erstellt, und zwar sechs Werten zwischen 0,025 und 1,0 mg Rinder-serumalbumin/ml.

20 μl Probengemisch werden mit 250 μl frischem Kupfer-reagens C versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen.

Nach Zusatz von 25 μl Folin-Ciocalteus-Reagens (verdünnt mit 2 % Na_2CO_3 im Verhältnis 1:2) nochmaliges Stehenlas-

len für 25 - 30 min in der Dunkelheit.

Die Messung der Extinktion im Photometer erfolgt bei 772 nm, wobei ein gleichbehandelter Ansatz mit Wasser statt Probenmaterial als Leerwert mitläuft.

Auf die Eichkurve bezogen ergeben sich dann die Proteinwerte in mg Protein/ml.

3.4 Herstellung von ^{14}C -F-1-P

Zur Diagnostik der hereditären Fruktoseintoleranz wurde außer der in der Einleitung bereits erwähnten FBPase-Messung auch die Messung von F-1-P-Aldolase in Dünndarmmukosa durchgeführt, und zwar mittels Ionenaustauschchromatographie durch Minisäulen, einer Methode nach Shin et al (59).

Das dafür notwendige Substrat ^{14}C -F-1-P stellten wir selbst her, um damit die Aldolase-Reaktion mit radioaktivem Substrat ablaufen zu lassen und hinterher von der Menge des in radioaktiv markiertes Produkt umgesetzten ^{14}C -F-1-P auf die Enzymaktivität zu schließen.

3.4.1 Gewinnung von Fruktokinase aus Rattenleber nach Staub und Vestling (60)

5 g Rattenleber werden in 30 ml Aceton pro Gramm Leber von Hand homogenisiert, das Aceton unmittelbar danach

durch einen Saugrahmen entfernt. Der entstehende Filterkuchen wird unter Verwendung von CaCl_2 vakuumgetrocknet, wobei ein mindestens 14 Tage haltbares Pulver resultiert.

Im weiteren extrahiert man hieraus die Fruktokinase durch Hinzufügen von 20 ml eisgekühltem KPO_4^- -Puffer (pH 7,6; 0,154 M) pro Gramm Pulver; diese Lösung steht bei 0°C 30 Minuten lang. Danach erfolgt eine zehnminütige Zentrifugation bei 2.000 Upm, wodurch eine Trennung des inaktiven Leberproteins vom noch aktiven Enzym erleichtert werden soll; dem gleichen Zweck dient auch die folgende Hitzebehandlung:

Der klare Überstand wird für ca. 2 Minuten in einem Wasserbad bei 70°C erhitzt, danach sofort in Eis gekühlt und wiederum zentrifugiert (0°C , 4800 Upm, 25 Minuten).

Im jetzt resultierenden Überstand befinden sich nach Staub und Vestling 90 % der Fruktokinase-Aktivität.

Die letzte Maßnahme zur Konzentrierung besteht in einem 24-stündigen Einfrieren dieses Überstandes in einem Trennungstrichter. Beim anschließenden Auftauen setzt sich deutlich ein stärker angefärbter Teil des Inhalts auf dem Trichtergrund ab. Dieser wird zur Trennung der Komponenten abgelassen und verworfen. Mit dem verbleibenden Rest wird die Prozedur (Einfrieren - Auftauen - Komponententrennung) noch einmal wiederholt, so daß nur die weniger dichte Portion des Systems übrigbleibt; hierin ist der größte Teil der Fruktokinase-Aktivität konzentriert.

3.4.2 Messung der Fruktokinase-Aktivität durch Herstellung von ^{14}C -F-1-P aus ^{14}C -Fruktose

Die gewonnene Fruktokinase wird jetzt dazu benutzt, die Synthese von ^{14}C -F-1-P aus radioaktiver Fruktose zu katalysieren.

Puffergemisch:

- 5 Teile KPO_4^- -Puffer, 0,2 M, pH 7,6
- 1 Teil MgCl_2 , 0,32 M
- 1 Teil ATP 1 g/10 ml

Zu 10 Teilen dieses Puffergemisches gibt man je 1 Teil kalte Fruktose (1 mM) und 1 Teil ^{14}C -Fruktose (10 $\mu\text{Ci/ml}$) und erhält so ein 'Fruktosepuffergemisch'.

Da wir die Reinheit des selbst hergestellten Fruktokinaseextraktes überprüfen wollten bzw. einen Umsatz zu F-6-P durch eventuell vorhandene Hexokinase in diesem Extrakt erfassen wollten, ließen wir auch einen Testansatz mit ^{14}C -Glukose als radioaktivem Substrat parallel laufen:

'Glukosepuffergemisch':

- 10 Teile Puffergemisch
- 1 Teil kalte Glukose, 1 mM
- 1 Teil ^{14}C -Glukose, 10 $\mu\text{Ci/ml}$.

3.4.2.1 Testansatz

50 μl Fruktosepuffergemisch bzw. Glukosepuffergemisch
10 μl Fruktokinaseextrakt

Inkubation des Testansatzes bei 37°C für 30 Minuten; danach Abstoppen der Reaktion durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C .

3.4.2.2 Auswertung

Die Auswertung erfolgt durch Radioaktivitätsmessung im Szintillationszähler. Dabei wird zuvor das radioaktive Substrat ^{14}C -Fruktose vom radioaktiven Produkt ^{14}C -F-1-P mittels Ionensäulenaustausch-Chromatographie nach Shin et al getrennt (59). Die Genauigkeit dieser Trennung bildet die Grundlage für die Exaktheit der Meßmethode.

- 2 ml-Spritzen werden mit destilliertem Wasser gut gespült und der Boden mit einem Stück Glaswolle gestopft.
- Diese 'Säulen' werden in eine Halterungsvorrichtung gehängt und bis zur 1,5 cm-Markierung mit DEAE-Zellulose, Cl^{-} -Form, gepackt.
- Equilibrieren der Säulen durch dreimaliges Spülen mit 1,5 ml H_2O .
- Vorsichtiges Auftragen von 50 μl des Reaktionsgemisches auf jede Säule; die Reste werden für den 100 %-Aktivitätswert gesammelt.
- Elution des nicht umgesetzten radioaktiven Substrates ^{14}C -Fruktose durch Spülen der Säulen mit 3 x 2 ml H_2O . Die einfach negativ geladenen PO_4^{-} -

Gruppen des radioaktiv markierten Produktes $^{14}\text{C-F-1-P}$ bleiben in der Zellulose hängen, wo sie beim entsprechenden pH-Wert den Platz der Cl^- -Ionen einnehmen.

- Verwerfen der in den jeweiligen Vials aufgefangenen Flüssigkeit und Ersetzen der alten durch neue Vials unter den Säulen.
- Eluieren des negativ geladenen adsorbierten $^{14}\text{C-F-1-P}$ durch Spülen mit 2 x 1,5 ml 150 mM HCl, welches die Phosphate vom festen Träger verdrängt.
- Mischen des Eluates mit 18 ml Quickszint pro Vial.
- Zählen der Radioaktivität im Counter.

Die 100 %-Werte, das heißt die Gesamtradioaktivität in 50 μl , mit Hilfe derer und der gemessenen absoluten Aktivität man auf die relative Enzymaktivität rückrechnen kann, erhält man durch das Sammeln von 50 μl Probenextrakt, den man ohne Säulenlauf im Counter zählt.

Entsprechend der Verunreinigung des Fruktokinase-Extraktes durch Hexokinase erhält man aus den Ansätzen mit Glukosepuffergemisch umso höhere Radioaktivität, je mehr Hexokinase im Ansatz vorhanden war, bzw. je mehr $^{14}\text{C-F-6-P}$ statt $^{14}\text{C-F-1-P}$ synthetisiert wurde und damit die Ergebnisse verfälscht. Nur Fruktokinaseextrakt mit minimaler Hexokinase-Aktivität ist zur $^{14}\text{C-F-1-P-Synthese}$ brauchbar.

3.4.3 Synthese von ^{14}C -F-1-P aus ^{14}C -Fruktose

Die Methode basiert auf demselben Prinzip wie die unter 3.4.2 beschriebene, mit dem Unterschied, daß zur Elution des radioaktiven Produktes 0,5 M TRAP-Puffer verwendet wird. Somit ist das ^{14}C -F-1-P für weitere enzymatische Messungen verwertbar.

Testansatz:

- 80 μCi ^{14}C -Fruktose
- 0,5 ml Puffergemisch (siehe 3.4.2)
- 0,2 ml Fruktokinaseextrakt geeigneter Fraktion.

Dieses Gemisch wird 30 Minuten bei 37°C inkubiert, die Reaktion dann durch Erhitzen auf 95°C gestoppt.

Gewinnung des radioaktiven Produktes durch Ionensäulenaustausch-Chromatographie:

- 10 ml-Spritzen werden gespült und 10 cm hoch mit DEAE-Zellulose, OH^{-} -Form, gepackt.
- Equilibrieren der Säulen mit 20 ml H_2O .
- Auftragen von ca. 0,7 ml Reaktionsgemisch pro Säule.
- Elution der nicht umgesetzten, das heißt nicht negativ geladenen Radioaktivität durch 3×2 ml H_2O
- Auswechseln der Vials.
- Elution des an die Zellulose adsorbierten ^{14}C -F-1-P durch Spülen mit je 2 ml TRAP-Puffer, pH 7,6; 0,5 M,

und Sammeln dieser Portionen.

Die Abbildung 4 zeigt die Elutionsmuster des in diesen 2 ml-Fractionen aufgefangenen radioaktiven Produktes $^{14}\text{C-F-1-P}$. Nach Spülung mit ca. 40 ml Puffer ist nur noch geringe Restaktivität vorhanden. Zur zweckmäßigen Verwendung des gewonnenen $^{14}\text{C-F-1-P}$ sammelt man jeweils ähnlich konzentrierte Fractionen in unterschiedlichen Vials und friert sie bei -20°C ein.

Die Mehrgipfeligkeit der Kurve ist darauf zurückzuführen, daß das Produkt $^{14}\text{C-F-1-P}$ teilweise in einer leichter eluierbaren, weil nicht zu fest adsorbierten Ringform vorliegt. Es handelt sich jedoch bei beiden Peaks um $^{14}\text{C-F-1-P}$.

3.5 Herstellung von $^{14}\text{C-F-6-P}$ als Substrat für die Phosphofruktokinase-Reaktion

Die Phosphorylierung von $^{14}\text{C-Fruktose}$ zu $^{14}\text{C-F-6-P}$ mit Hexokinase als katalysierendem Enzym erfolgt analog der Fruktokinase-Reaktion, wie sie unter 3.4.3 beschrieben wurde.

Wir benutzten lediglich im Testansatz anstelle von 0,2 ml Fruktokinaseextrakt 5 μl einer synthetischen Hexokinase (Sigma), und eluierten das Reaktionsprodukt $^{14}\text{C-F-6-P}$ nicht mit TRAP-Puffer, sondern mit 0,1 M KHPO_4^- -Puffer bei einem pH von 7,6.

Wie aus Abbildung 5 ersichtlich ist, war $^{14}\text{C-F-6-P}$

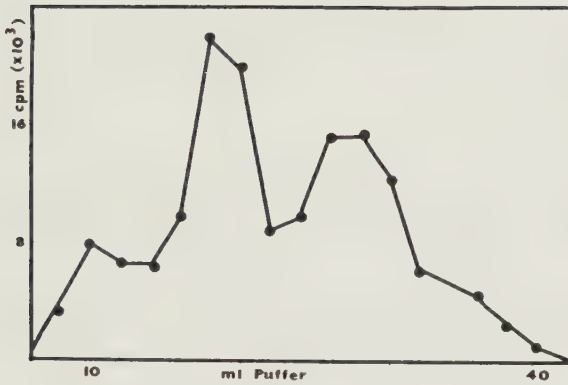


Abb. 4: Elution von ^{14}C -F-1-P aus den Ionenaustauschsäulen durch Zugabe von je 2 ml Puffer; zur Mehrgipfeligkeit der Kurve siehe Text (3.4).

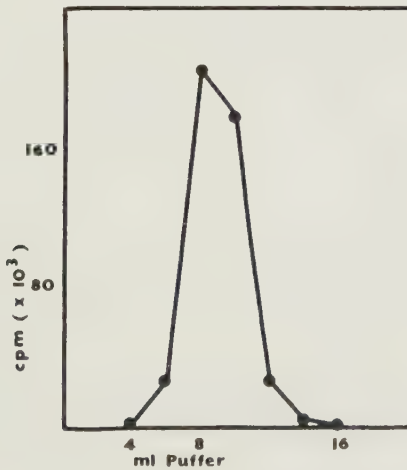


Abb. 5: Elution von ^{14}C -F-6-P aus den Ionenaustauschsäulen durch Zugabe von je 2 ml Puffer (siehe 3.5)

schon nach sechsmaligem Spülen mit je 2 ml Puffer gänzlich eluiert.

3.6 Bestimmung der Phosphofruktokinase-Aktivität in Erythrozyten und Muskelgewebe

Bei dem hier beschriebenen Verfahren handelt es sich um eine Isotopenmethode nach Shin et al, wie sie analog bereits zur Messung der F-1-P-Aldolase (59), der Galaktokinase (58) und anderer Enzyme verwendet wurde.

Als Tracer werden Radioisotope benutzt, deren Konzentration durch Szintillationszählung ermittelt wird (wie auch unter 3.4 beschrieben), nachdem vorher das radioaktiv markierte Substrat vom radioaktiven Produkt durch Ionensäulenaustausch-Chromatographie getrennt wurde.

3.6.1 Testansatz

- 3 Teile MgCl_2 , 10 mM
- 2 Teile F-6-P, 9 mM
- 1 Teil ATP, 15 mM
- 1 Teil ^{14}C -F-6-P (hergestellt wie in 3.5)
- 1 Teil EDTA, 2 mM
- 1 Teil DTT, 25 mM
- 1 Teil NH_4Cl , 10 mM

Das Erythrozyten-Konzentrat wird in KPO_4^- -Puffer, pH 7,6,

0,154 M, auf 1:200 verdünnt; Frischmuskel sonifiziert man zweckmäßig in 100 μ l Puffer pro mg und verdünnt dann weiter auf 1:5.

50 μ l des oben beschriebenen Reaktionsgemisches werden sodann mit 50 μ l des Erythrozyten- bzw. Muskelextraktes für 20 Minuten bei 37⁰ C inkubiert. Je nach vorhandener PFK-Aktivität wird in dieser Zeit mehr oder weniger des radioaktiven Monophosphates ¹⁴C-F-6-P in das radioaktive Diphosphat ¹⁴C-F-1,6-P₂ übergeführt.

Die Reaktion wird durch vierminütiges Erhitzen auf 95⁰ C gestoppt.

3.6.2 Trennung des Produktes vom Substrat

Wie bereits erwähnt, wird das radioaktive Produkt mittels fraktionierter Elution aus DEAE-Zellulosesäulen gewonnen. Die Minisäulen sind bis zur 1,5 cm-Markierung mit Cl⁻-Zellulose gepackt und mit 25 mM HCl equilibriert.

Diese Konzentration begünstigt die Bindung der stärker geladenen Pyrophosphate an die Zellulose, während die schwächer geladenen Monophosphate durch die Säureanionen bereits verdrängt werden.

Nach Auftragen von 80 μ l des Reaktionsgemisches auf die Zellulose wird der vorhandene Monophosphatanteil durch 4-maliges Spülen mit 2 ml 25 mM HCl ausgewaschen und danach die Vials mit dem Eluat durch frische ersetzt.

Die noch an die feste Phase der Zellulose gebundene ¹⁴C-F-1,6-P₂-Fraktion spült man nun mit 2 x 1,5 ml einer

150 mM HCl aus den Säulen.

Nach Zugabe von 18 ml Quickszint zählt man die Radioaktivität im Counter; für den 100 %-Wert, der für die Errechnung der relativen Enzym-Aktivität benötigt wird, werden 80 μ l von Reaktionsgemisch gesondert gesammelt und gezählt.

Die Leerwerte, das heißt also der Anteil an Radioaktivität, der nicht auf Enzym-Aktivität, sondern auf Verunreinigung und Meßfehler zurückzuführen ist, erhält man durch Messung eines identisch behandelten Testansatzes, bei dem lediglich das aktive Enzymprotein vor der Inkubation durch Hitzebehandlung (95⁰ C, 5 Minuten) zerstört wurde.

3.6.3 Berechnung der Enzymaktivität

Die Berechnung der in der Erythrozytenprobe vorhandenen PFK-Aktivität erfolgt nach der Formel:

$$\frac{\Delta \text{cpm} \times \text{mM F-6-P} \times \text{Teile F-6-P} \times 100 \times \text{Vol. Gemisch}}{100 \% \text{ cpm} \times \text{g Hb} \times \text{Teils insg.} \times \text{min} \times \text{Probenvol.}}$$

Die resultierenden Aktivitätswerte ergeben sich somit in μ Mol Substratumsatz/Minute/g Hb.

Bei PFK-Messung in Muskelbiopsat wird der Substratumsatz auf 1 mg des in der Probe enthaltenen Proteins bezogen.

3.7 Aktivierung der Phosphofruktokinase-Aktivität durch Zusatz von F-2,6-P₂ bzw. Leukozytenextrakt von HFI-Patienten

Hierfür benutzten wir dieselbe Methode mit einem anderen Ansatz des Reaktionsgemisches, der speziell auf die verwendete, aus 'potato tuber' extrahierte Phosphofruktokinase von Sigma abgestimmt war.

Testansatz:

- 75 µl TRIS-Puffer, 0,1 M, pH 8,0
- 40 µl F-6-P, 9 mM
- 10 µl G-6-P, 0,1 M
- 5 µl ¹⁴C-F-6-P (selbst hergestellt)
- 40 µl 'potato tuber' PFK, 1 U/2 ml
- 20 µl PP_i, 30 mM

Zu diesem Testansatz gaben wir vor der 20-minütigen Inkubation jeweils definierte Mengen an F-2,6-P₂, so z.B.:

- 10 µl F-2,6-P₂, 1 µM oder
- 10 µl F-2,6-P₂, 5 µM.

Dieses Vorgehen, sowie natürlich die Änderung der Substratkonzentration, ermöglicht kinetische Studien, z.B. in Hinblick auf Erreichen der Maximalaktivität des Enzyms, welches nur in Anwesenheit von F-2,6-P₂ aktiv ist.

Diese letztgenannte Eigenschaft machten wir uns auch bei dem Versuch zunutze, die Enzymaktivität durch Zuga-

be von 1:10 verdünntem, durch Hitze vorbehandelten HFI-Leukozytenextrakt zu steigern.

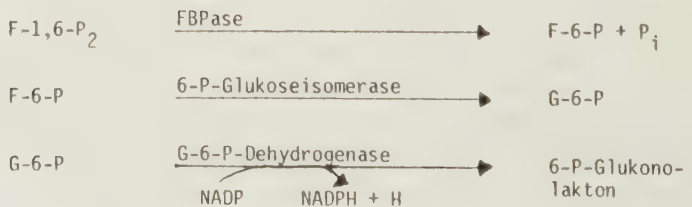
Vom Grad der jeweiligen Aktivitätszunahme bei Zugabe von 10 μ l des Leukozytenextraktes von HFI-Patienten läßt sich auf die entsprechende, im Extrakt vorhandene F-2,6-P₂-Konzentrationen rückrechnen.

Die Aktivitätsmessung erfolgt genau wie unter 3.5.2 beschrieben durch Radioaktivitätsmessung im Counter nach Ionensäulenaustausch-Chromatographie.

3.8 Messung der FBPase-Aktivität in Leukozyten, Darmmukosa und Lebergewebe

Zur Messung der F-1,6-BPase-Aktivität verwandten wir eine spektrophotometrische Methode, bei der die Extinktionsänderung pro Minute entsprechend der zunehmenden NADPH-Konzentration bei 366 nm gemessen wurde (64).

Die zugrundeliegenden biochemischen Reaktionen sind folgende:



3.8.1 Testansatz

Puffer: Tris - Puffer 0,1 M
 EDTA, 1 mM
 MgCl_2 , 5 mM
 pH: 7,5

- 250 μl Puffer
- 10 μl NADP, 12 mM
- 2 μl G-6-P-Dehydrogenase
- 2 μl 6-P-Glukoseisomerase
- 50 μl Probe

Die Probe besteht jeweils aus in 150 μl KCl (0,15 M) sonifizierten und kurz zentrifugierten Leukozyten oder, im Falle von Darm- oder Lebergewebe, in einer 1:3 Puffer-Verdünnung des ebenfalls in KCl sonifizierten Biopsats (pro mg Gewebe 200 μl KCl).

Dieser Testansatz soll sich ca. 10 Minuten bei Raumtemperatur in der Meßkuvette equilibrieren, bevor die oben beschriebenen Reaktionen durch Zugabe von 10 μl F-1,6- P_2 (10 mM) als Substrat gestartet wird.

Wir maßen im folgenden 45 Minuten lang 3 x pro Minute die Extinktion, wobei - gemäß der vorhandenen Enzymkonzentration - eine stetige Zunahme des NADPH und damit auch der Extinktionswerte zu verzeichnen war.

Die empfindliche Methode ermöglicht es also, selbst geringste Extinktionsänderungen festzuhalten und damit Konzentrationsbestimmungen von FBPase-Aktivitäten selbst in Leukozyten vorzunehmen, wo diese um 1-2 Zehnerpotenzen unter den Darm- und Leberaktivitätswerten liegen.

3.8.2 Auswertung

Die Berechnung der Enzymaktivität in nMol Substratumsatz/min / mg Protein erfolgt unter Berücksichtigung des in derselben Probe nach Lowry gemessenen Proteingehaltes in mg / ml nach der Formel:

$$\frac{\Delta E \times \text{Testvolumen} \times 1000}{\text{min} \times \text{Probenvolumen} \times 6 \times \text{mg Protein/ml}}$$

3.9 Hemmung der FBPase-Aktivität durch Zusatz von verschiedenen Konzentrationen F-2,6-P₂ bzw. Leukozytenextrakt von HFI-Patienten

Zur Hemmung der FBPase-Aktivität durch mikromolare F-2,6-P₂-Konzentrationen benutzten wir einen nach 3.8.1 variierten Testansatz.

Um Endkonzentrationen von 3 - 20 µM F-2,6-P₂ zu erreichen, ersetzten wir im Versuch je 10 µl Puffer durch 10 µl einer 0,1 - 1 mM F-2,6-P₂-Lösung.

Mit diesen Gemischen verfahren wir genau wie unter 3.8.1 beschrieben, nicht ohne pro Meßreihe eine Kuvette ohne Effektor, das heißt F-2,6-P₂, als Referenz für die ungehemmte, 100 %-ige Aktivität mitlaufen zu lassen.

Zur Bestimmung der F-2,6-P₂-Konzentration in Leukozytenextrakt von HFI-Patienten ersetzten wir 30 µl des Puf-

fers im selben Testansatz durch 30 μ l des geheizten Leukozytenextraktes, der, wie bereits erwähnt, in 150 μ l KCl sonifiziert und kurz zentrifugiert worden war.

Durch den Grad der Enzymhemmung auf mehr oder weniger Prozent der Ausgangsaktivität, das heißt der ungehemmten FBPase-Aktivität, läßt sich unter Zuhilfenahme einer Eichgeraden die im Leukozytenextrakt vorhandene Konzentration von F-2,6- P_2 ersehen.

Die notwendige Eichgerade bestimmten wir jeweils speziell für die einzelnen Meßreihen durch Bestimmung der Aktivität bei bekannten F-2,6- P_2 -Konzentrationen im Bereich von 3 - 20 μ M.

3.10 F-1-P Aldolasemessung nach Shin et al (59)

Die Messung der F-1-P-Aldolaseaktivität war im Rahmen dieser Studie nur dazu nötig, die brauchbaren Blutproben von HFI-Patienten für die FBPase-Messung zu selektieren und soll daher nur kurze Erwähnung finden.

Das Verfahren basiert analog dem für die PFK-Messung auf Ionensäulenaustausch-Chromatographie und der Zählung derjenigen Isotope im Counter, die durch letztere von nicht umgesetztem radioaktiv markiertem Substrat isoliert wurden.

Gezählt wird ^{14}C -Glycerinaldehyd, das, im Gegensatz zum radioaktiven Substrat ^{14}C -Dihydroxyacetonphosphat

mit H_2O aus den Säulen eluiert werden kann, während die Phosphate an die OH^- -Form der DEAE-Zellulose binden.

Die Aldolasereaktion läuft vorher 60 Minuten lang bei $37^{\circ}C$ ab, bevor sie gestoppt wird, wobei vier verschiedene Testansätze mit jeweils unterschiedlichen nicht ^{14}C -markierten F-1-P-Substrat-Konzentrationen verwendet werden.

Die Menge des zugesetzten ^{14}C -F-1-P hingegen bleibt immer dieselbe, so daß bei geringeren F-1-P-Konzentrationen eine relativ höhere ^{14}C -F-1-P-Umsatzrate resultiert; ein Umstand, der eine einfache Darstellung der Enzymkinetik im Lineweaver-Burk-Diagramm ermöglicht.

Testansatz:

- 2 Teile F-1-P (20 mM, 10 mM, 5 mM, 2,5 mM, das heißt Endkonzentrationen von 2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM)
- 1 Teil ^{14}C -F-1-P
- 7 Teile Puffer (TRAP: 0,1 M/EDTA: 0,01 M/ph 7,6)

30 μl dieses Testgemisches werden mit 30 μl der Probe inkubiert.

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgt nach der Formel:

$$\frac{(\Delta \text{cpm} - \text{Leerwert}) \times (\text{F-1-P}) \times \text{Testvol.}}{100 \% \text{ cpm} \times \text{min} \times \text{mg Protein/ml} \times \text{Probenvol.}}$$

und ergibt sich in nmol Substratumsatz/min/mg Protein.

4. ERGEBNISSE

4.1 Phosphofruktokinase-Messung

4.1.1 Normwerte

Tabelle 2 zeigt eine Aufstellung der von uns in Erythrozyten gesunder Kontrollpersonen gemessenen Phosphofruktokinase-Aktivitäten.

Es stellte sich heraus, daß keine signifikanten Aktivitätsunterschiede in verschiedenen Altersgruppen bestehen, zumindest in unserem Probandenkollektiv, das Säuglinge ab 3 Monate, Kleinkinder, Schulkinder, Jugendliche und Erwachsene bis 50 Jahre umfaßte.

Die Normalwerte für die PFK-Aktivität in Erythrozyten liegt bei unserer Isotopenmeßmethode demnach zwischen 6 und 10 μMol Substratumsatz / min / g Hb, gesetzt den Fall, es handelt sich um frisches Probenmaterial, das nur einmal und höchstens zwei bis drei Tage lang eingefroren und gleich nach dem ersten Auftauen verarbeitet wurde (Tabelle 2 a).

Ältere sowie mehrfach aufgetaute und wieder eingefrorene Proben zeigen weit geringere Aktivitäten (Tabelle 2b; Abb. 6); analog dazu maßen wir in frischem Muskelbiopsiegewebe Normalaktivitäten zwischen 35 und 70 nMol Substratumsatz / min / mg Protein (auch hier zeigten kindliche und adulte Proben denselben Normbereich) (Tab. 2c), während in älteren und mehr als eine Woche eingefrorenem Muskel die Aktivität auf weniger als die Hälfte bis zu 20 % reduziert war (Tabelle 2d; Abb. 7).

Tabelle 2: Normalwerte der Phosphofruktokinase-Aktivität

a) in frischen, nur ganz kurz eingefrorenen Erythrozyten;
 Aktivität gemessen in $\mu\text{Mol} / \text{min} / \text{g Hb}$

Name	Δ cpm	Hb-Wert (in Testverdünng.)	Aktivität
Z.	4713	0,100	8,595
O.	2350	0,055	7,792
Z.	3100	0,100	6,549
S.	4374	0,112	8,722
Sch.	4801	0,124	8,650
D.	5434	0,139	8,377
S.	3876	0,100	6,840
Sch.	3586	0,100	6,328
L.	6088	0,130	7,822
Lm.	5305	0,125	8,052
M.	4958	0,131	6,746
Ma.	8240	0,131	11,873
L.	5974	0,129	8,201
H.	6312	0,125	9,038
A.	5944	0,120	8,816
Sch.	4576	0,120	6,724
Ho.	4350	0,129	6,555
H.	4500	0,138	6,338
Wei.	4823	0,131	7,122
Wei.	4002	0,110	7,200
A.	3856	0,106	6,538
V.	5543	0,117	7,920
K.	3504	0,122	5,250
R.	6287	0,129	8,651
Ko.	12411	0,164	8,126
Ko.	12276	0,175	9,054
B.	6566	0,161	6,849
F.	6924	0,143	8,012
A.	6921	0,129	8,897
H.	4172	0,134	6,212
E.	3631	0,113	6,427
D.	7208	0,147	9,194
P.	7544	0,170	7,396
Sh.	6590	0,165	6,667
G.	6488	0,164	6,650
Ph.	7321	0,168	7,400
F.	7200	0,146	9,012
A.	3764	0,111	6,418
F.	4344	0,132	6,344

b) in alten, 1-3 Wochen eingefrorenen und wieder aufgetauten Erythrozyten;

Aktivität gemessen in μMol Substratumsatz / min / g Hb

Name	Δ cpm	Hb-Wert (in Testverdünng.)	Aktivität (ca. 40-50% d. Ausgangswerte)
E.	1636	0,116	2,735
Es.	2022	0,127	2,667
J.	1583	0,119	2,711
Sch.	2032	0,129	2,952
H.	1401	0,121	3,235
K.	2578	0,147	3,888
F.	2990	0,120	4,576
Z.	2239	0,106	4,520
Nn.	2573	0,126	4,274
Dr.	862	0,131	1,569

c) in frischem Muskelbiopsat;

Aktivität gemessen in nMol Substratumsatz / min / mg Protein

Name	Δ cpm	Proteinwert (mg / ml)	Aktivität
A.	12416	0,411	62,293
Sch.	12546	0,415	56,347
K.	15247	0,477	55,309
Ko.	11559	0,650	32,999
F.	12467	0,594	39,211

- d) in mehrere Wochen eingefrorenem Muskelbiopsat;
 Aktivität gemessen in nMol Substratumsatz /
 min/mg P.

Name	Δ cpm	Proteinwert (mg / ml)	Aktivität (ca. 30% d.A.)
D.	4678	0,451	21,862
F.	2488	0,413	10,250

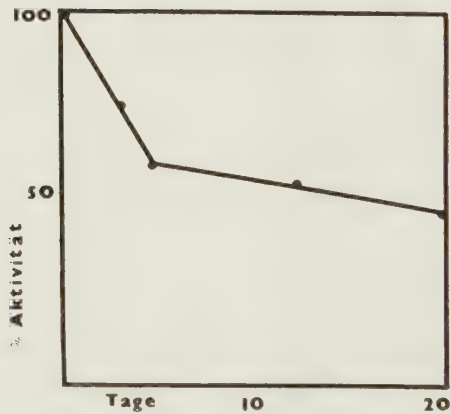


Abb. 6: Abnahme der Phosphofruktokinaseaktivität in Erythrozyten in Relation zur Zeit.

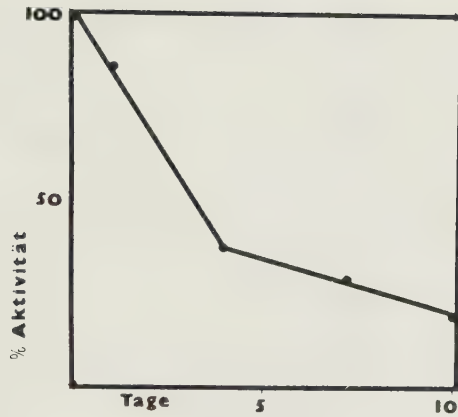


Abb. 7: Abnahme der Phosphofruktokinaseaktivität in Muskelbiopsat in Relation zur Zeit

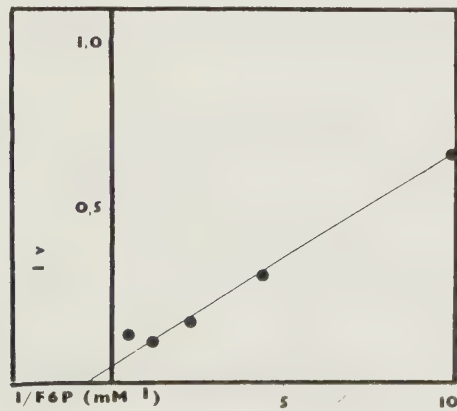


Abb. 8: Lineweaver - Burk - Diagramm zur Phosphofruktokinasekinetik bei steigenden Substratkonzentrationen in Erythrozyten

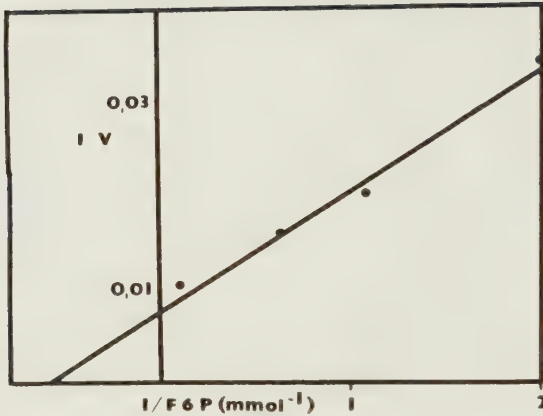


Abb. 9: Lineweaver-Burk-Diagramm zur Phosphofruktokinase-kinetik bei steigenden Substratkonzentrationen in Muskelgewebe

Bei Kindern mit hereditärer Fruktoseintoleranz fanden sich die PFK-Werte in Erythrozyten im Normbereich, das heißt von 7,9 - 8,5 $\mu\text{Mol} / \text{min} / \text{g Hb}$. Es konnten vielerlei Unterschiede im Verhalten der Enzymaktivität zwischen Säugling und Kleinkind festgestellt werden.

4.1.2 Enzymkinetik

Über die Enzymkinetik bei unterschiedlich hohem Substratangebot unterrichten die Abbildungen 8 und 9.

Im Lineweaver-Burk-Diagramm ergeben sich für Muskel- und Erythrozytenenzym ähnliche K_M -Werte, nämlich F-6-P-

Konzentrationen um 1,5 - 1,6 mM. In unserem Testansatz arbeiteten wir - wie aus 3.6.1 ersichtlich - mit Substrat-Konzentrationen von 0,9 mM.

Dies erwies sich in unseren kinetischen Studien als am günstigsten, zumal bei Substratkonzentrationen über 2 mM eine Substrathemmung vorzuliegen scheint (Abb. 8).

4.1.3 Phosphofruktokinase-Aktivierung durch F-2,6-P₂

Um den Einfluß der F-2,6-P₂-Konzentrationen auf die PFK-Aktivität zu messen, verwandten wir ein pyrophosphat-abhängiges Enzym aus 'potato tuber' von Sigma.

In einem wie unter 3.7 beschriebenen Testansatz stieg die PFK-Aktivität direkt proportional zu den aufsteigenden F-2,6-P₂-Konzentrationen im Bereich von 0 bis 10 μ M F-2,6-P₂ linear an.

Bei höheren F-2,6-P₂-Spiegeln läßt sich zwar noch eine weitere Aktivitätssteigerung erzielen, jedoch nur bis zu einem unterschiedlich schnell erreichten Punkt der Maximalaktivierung. Dieser Bereich eignet sich selbstverständlich nicht mehr zur Messung des F-2,6-P₂-Gehaltes, ein Umstand, auf den später noch einzugehen ist (5.1).

Die Empfindlichkeit der Methode wird zusätzlich durch die extreme Labilität auch des angereicherten Enzyms beeinträchtigt. Nur mit frischer PFK läßt sich die F-2,6-P₂-Abhängigkeit deutlich darstellen (siehe Abb. 10), während schon nach 10 Tagen keine meßbaren Enzymaktivitäten mehr vorhanden sind.

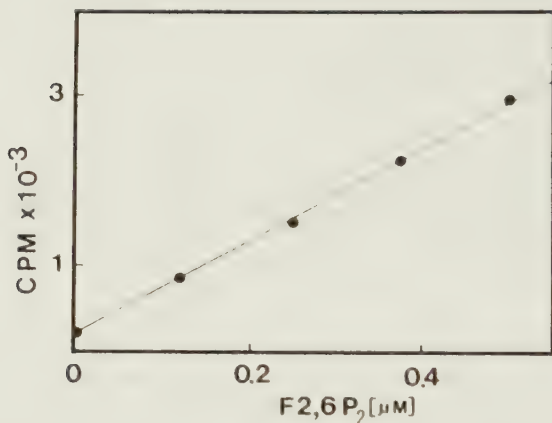


Abb. 10: Abhängigkeit der PFK-Aktivität von der F-2,6-P₂-Konzentration im Testansatz

4.1.4 Aktivierung der PFK durch Leukozytenextrakt von HFI-Patienten

Zur Überprüfung der Hypothese, daß in Leukozytenextrakt von HFI-Patienten eventuell angereichertes F-2,6-P₂ ebenso in der Lage sein müßte wie synthetisches, die PFK-Reaktion zu aktivieren, maßen wir diese in einem identischen Testansatz, dem lediglich anstelle von 10 μl Puffer 10 μl eines 1:10 verdünnten Leukozytenextraktes zugesetzt waren.

Der 100 %-Wert der zugesetzten Radioaktivität lag bei 54 000 cpm; den prozentualen Anteil des davon umgesetzt-

ten ^{14}C -F-6-P in radioaktives Produkt ohne und mit Leukozytenextrakt zeigt Abbildung 11.

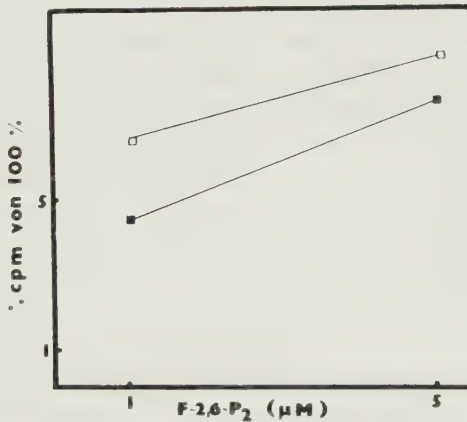


Abb. 11: Prozentualer Anteil des mit Hilfe von im Testansatz befindlicher PFK umgesetzten ^{14}C -F-6-P bezogen auf die Maximalaktivität.

- : Testansatz ohne Zusatz von HFI-Leukozytenextrakt
- : Testansatz mit Zusatz von HFI-Leukozytenextrakt, ansonsten identisch

Dabei wird eine deutliche Aktivierung durch den Leukozytenextrakt offenbar.

Diese Steigerung der Substratumsatzrate durch Patientenleukozyten bzw. das darin befindliche F-2,6-P₂ ließ sich auch bei Zugabe größerer Mengen des Extraktes nachweisen, jedoch nahm die Aktivität nicht mehr proportional der zugesetzten Extraktmenge zu; diese Tatsache deutet darauf hin, daß mit einer bestimmten F-2,6-P₂-Kon-

zentration eine Maximalaktivierung erreicht wird, über die hinaus keine weitere Steigerung erzielt werden kann. Dieses Ergebnis entspricht genau unseren PFK-Messungen mit F-2,6-P₂-abhängigem Enzym (4.1.3).

Andererseits ließ sich die PFK-Reaktion nicht in Gang setzen, wenn überhaupt kein F-2,6-P₂ außer dem in den Leukozyten befindlichen zugesetzt wurde; F-2,6-P₂-Spiegel unter 0,05 μ M im beschriebenen Testansatz waren zu niedrig.

4.1.5 Überprüfung der Testmethode

Um auszuschließen, daß die Enzymaktivierung bei unserer Methode durch einen anderen Metaboliten im Patienten-Leukozytenextrakt verursacht wurde, nämlich durch F-6-P (was ja bei HFI wie auch F-1-P in erhöhter Konzentration vorliegen kann), wandten wir folgendes Verfahren an:

Gemessen wurden zwei Testansätze nach 3.7, wobei das nötige Substrat F-6-P nicht zugegeben wurde, sondern lediglich in ganz geringer Konzentration als ¹⁴C-F-6-P vorhanden war. Dem einen Testansatz fügten wir vorbehandelten Leukozytenextrakt zu, dem anderen nicht; nach Ablauf der Reaktion ergaben sich für die beiden Ansätze beinahe identische Werte (wiederholt gemessen).

Dieses Resultat verdeutlicht, daß das eventuell im Leukozytenextrakt vorhandene F-6-P nicht in der Lage ist, die PFK-Reaktion unter den gegebenen Bedingungen zu aktivieren. Dies steht in Einklang mit der Tatsache,

daß für unsere F-2,6-P₂-abhängige Aktivierung die Anwesenheit einer gewissen Menge F-6-P (Substrat!) nötig ist, was in diesem Versuch offenbar nicht der Fall war.

Bei hinreichenden F-6-P-Konzentrationen im Leukozytenextrakt hätte die Aktivierung durch das ohnehin im Testansatz befindliche F-2,6-P₂ umso deutlicher ausfallen müssen.

Aufgrund dieser Beobachtungen scheint es berechtigt, die Aktivierung der PFK-Reaktion durch HFI-Leukozytenextrakt tatsächlich auf F-2,6-P₂ zurückzuführen.

4.1.6 Messung der F-2,6-P₂-Werte in Patientenleukozyten

Unter Zuhilfenahme einer jeweils neu für die entsprechende Probe hergestellte Eichgerade lassen sich die F-2,6-P₂-Konzentrationen im Patientenblut der HFI-Kinder aus dem Grad der Aktivierung ermitteln.

In zwei Testansätzen, jeweils einmal mit und einmal ohne Zugabe einer bekannten Menge Leukozytenextrakt, wird die PFK-Reaktion hinsichtlich ihrer in cpm gemessenen Aktivität verglichen (siehe Abb. 12):

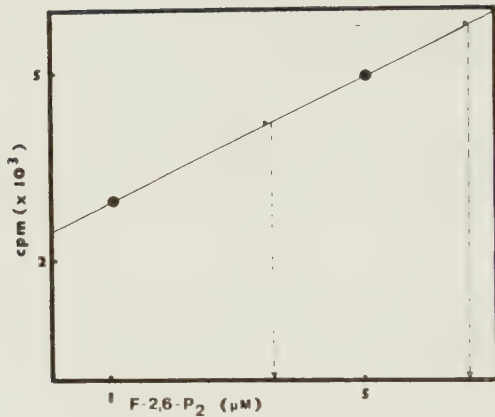


Abb. 12: Steigerung der PFK-Reaktion durch Zugabe von Leukozytenextrakt zu einem Testansatz mit bekannter F-2,6-P₂-Konzentration

Aus der Menge der zugesetzten Leukozyten läßt sich auf den F-2,6-P₂-Gehalt im Blut rückrechnen. Wir verwandten jeweils Leukozyten aus 13,3 μl Vollblut.

Interessanterweise ergaben sich bei unseren Studien im Falle von höheren im Testansatz befindlichen F-2,6-P₂-Konzentrationen niedrigere Werte für den F-2,6-P₂-Gehalt im Patientenblut als in vergleichbaren Tests mit denselben Patientenproben, denen aber weniger F-2,6-P₂ von vorneherein zugesetzt war.

Messungen, die als 'Doppelbestimmungen' ein- und derselben Probe eigentlich Duplikaten gleichzusetzen wären, unterschieden sich hinsichtlich ihrer Ergebnisse: Die Testansätze mit höheren F-2,6-P₂-Konzentrationen im Gemisch ergaben niedrige Werte für F-2,6-P₂ in den Leukozyten.

Auch dies deutet auf das bereits erwähnte Aktivierungsmaximum durch F-2,6-P₂ hin, welches in unseren Versuchen variierte und daher nicht genau festzulegen war.

Bei hohen F-2,6-P₂-Spiegeln ist die Präzision der Ergebnisse also in Frage gestellt.

Abschließend eine Tabelle mit den gemessenen F-2,6-P₂-Werten in Leukozyten von HFI-Patienten:

Tabelle 3: F-2,6-P₂-Konzentrationen in Leukozyten von HFI-Patienten, gemessen anhand des Aktivierungsgrades der PFK-Reaktion

	F-2,6-P ₂ (ng/mg Protein)	Patientenalter
1.	20,0	6 Monate
2.	10,0	2 Jahre
3.	7,3	2 Jahre
4.	9,2	2 Jahre
5.	6,2	2 Jahre

Die Messungen 2 und 3 sowie 4 und 5 entstammen jeweils demselben Probenmaterial und sollten Duplikaten gleichzusetzen sein. 3 und 5 enthielten mehr F-2,6-P₂ im Testansatz.

4.2 Fruktose-1,6-Bisphosphatasemessung

4.2.1 Ergebnisse und Normalwerte

Über die Normwerte der FBPase-Aktivität in Leukozyten gesunder Kinder (6 Monate - 14 Jahre) und Erwachsener sowie über Vergleichswerte aus menschlicher Darmmukosa sowie Ratten- und Schweineleber unterrichtet Tabelle 4.

Tabelle 4: Normwerte für Fruktose-1,6-Bisphosphatase

Name	Δ Extinktion	Protein (mg / ml)	Aktivität (nmol/min/mg P.)
a) in Leukozyten			
L.	0,0028	3,28	0,795
Li.	0,0022	2,99	0,795
M.	0,0015	3,00	0,540
Sch.	0,0025	3,00	0,900
W.	0,0020	1,60	1,350
H.	0,0009	1,56	0,623
R.	0,0022	3,95	0,602
W.	0,0021	1,37	1,655
Z.	0,0021	1,36	1,668
Sch.	0,0014	2,90	0,521
W.	0,0026	4,00	0,702
W.	0,0031	4,64	0,722
Z.	0,0009	1,29	0,753
Z.	0,0027	1,30	2,243
Sch.	0,0020	1,30	1,662
W.	0,0007	1,50	0,504
K.	0,0026	3,75	0,749

Fortsetzung Tabelle 4:

Name	Δ Extinktion	Protein (mg/ml)	Aktivität (nmol/min/mg P.)
Sch.	0,0019	2,58	0,795
F.	0,0023	2,35	1,057
Pö.	0,0050	3,09	1,748
Pö.	0,0054	3,09	1,887
H.	0,0059	2,94	1,910
K.	0,0048	3,70	1,401
K.	0,0038	3,70	1,109

b) in menschlicher Darmmukosa

1.	0,0041	0,14	31,629
2.	0,0031	0,23	14,557
3.	0,0042	0,23	19,722

c) in Schweineleber

1.	0,0186	0,18	111,600
2.	0,0147	0,36	44,100
3.	0,0229	0,37	66,843

d) in Rattenleber

1.	0,0256	0,38	72,758
2.	0,0324	0,39	89,723

Aus den Ergebnissen lassen sich Normbereiche für die Enzymaktivität in Leukozyten von 0,5 - 2,5 nmol Substratumsatz / min / mg Protein aufstellen; im Laufe der Versuche stiegen die Werte im unteren Normbereich um 0,1 - 0,2 nmol / min / mg Protein an, so daß Aktivitäten um 0,5 nmol / min / mg Protein schon als grenzwertig angesehen werden müssen.

In Dünndarmmukosa ergaben sich erwartungsgemäß 10 - 40fach höhere Enzymaktivitätswerte, in Rattenleberzellen 40-60fach höhere, in Schweineleber einmal sogar 100-fach größere Aktivität.

Wie auch bei der PFK-Messung ergab sich keine altersabhängige Änderung der Enzymaktivität bei den gesunden Probanden.

Außerdem überprüften wir die FB Pase-Aktivität in Leukozyten von HFI-Patienten, die in diesem Labor schon mehrfach stark erniedrigt gefunden wurde (siehe Tabelle 5). Wir fanden bei einem fünf Monate alten sowie bei einem 10 Monate alten Patienten deutlich erniedrigte Werte, bei einem 2-jährigen Kleinkind jedoch normale Enzymaktivität in Leukozyten; letztere wurde allerdings in einer Probe mit extrem niedrigem Proteingehalt (20 - 25 % der Norm) gemessen. Dasselbe Kind wies aber ein deutlich pathologisches Aktivitätsmuster in Dünndarmmukosa auf.

Interessanterweise war es trotzdem möglich, mit Leukozytenextrakt dieses Patienten (mit "normaler" FB Pase-Aktivität) die PFK-Reaktion zu aktivieren und die FB Pase-Reaktion zu hemmen (siehe 4.2.3).

Tabelle 5: Fruktose-1,6-Bisphosphatase-Aktivität in Geweben von HFI-Patienten

Person	Alter	Aktivität in nmol/min/mg Protein	
		Dünndarmmukosa	Leukozyten
HFI 1	10 M	1,10	0,15
HFI 2	6 M	--	0,24
HFI 3	2 J	6,98	1,08
Kontrollen		20 - 32	0,5 - 2,5

Bei der FBPase handelt es sich um ein Enzym, dessen Aktivität, wenn auch nicht in demselben Maß wie die der Phosphofruktokinase, so doch auch nur in relativ frischem Probenmaterial präzise meßbar ist.

Besonders die Aktivitätsbestimmung in Leukozyten basiert auf der Messung minimaler Extinktionsänderungen, speziell bei partieller Enzyminaktivierung durch verschiedene F-2,6-P₂-Konzentrationen.

Bei über zwei Wochen alten Proben ist in der Regel, auch wenn sie nur einmal aufgetaut wurden, kaum noch Aktivität nachweisbar.

4.2.2 Hemmung der FBPase-Reaktion durch F-2,6-P₂

Durch Zugabe von 10 µl 0,1 - 1 mM F-2,6-P₂ zu dem in 3.2 beschriebenen Testansatz, das heißt also bei F-2,6-

P_2 -Konzentrationen von 3 - 30 μM , ließ sich die Reaktion unterschiedlich stark hemmen.

Dabei ergab sich im Bereich von 0 bis 15 μM F-2,6- P_2 eine lineare Aktivitätsabnahme auf ca. 50 % der ungehemmten Enzymaktivität.

Innerhalb dieses Bereiches konnten die jeweiligen F-2,6- P_2 -Konzentrationen genau bestimmt werden, und zwar sowohl in Leukozyten (Abb. 13), wie auch in Rattenhepatozyten (Abb. 14).

Das Ausmaß der Hemmung durch F-2,6- P_2 war in beiden Probenmaterialien fast identisch: Durch eine bestimmte Menge F-2,6- P_2 ließen sich die Enzymaktivitäten in Leukozyten sowie in Leberzellen gleichermaßen hemmen, was auf ähnlich hohe Aktivität in den verschiedenen Geweben hindeutet.

Allerdings reagierte die Leukozyten-FBPase empfindlicher als die Rattenleber-FBPase auf lange Lagerung der Probe: Leukozyten, die wenige Tage alt waren, wiesen schon eine um mindestens 30 % verminderte FBPase-Aktivität auf, die zwar immer noch durch F-2,6- P_2 entsprechend zu hemmen war, für genaue F-2,6- P_2 -Bestimmungen aber bereits ohne Wert war.

Unser Meßbereich für kinetische Studien der FBPase lag, wie bereits erwähnt, zwischen 3 und 30 μM F-2,6- P_2 und umfaßt damit einen Großteil des Bereiches, in dem es physiologischerweise in Hepatozyten vorliegt, nämlich 0,11 - 11 μM . Wir bestimmten die Konzentration jedoch in Leukozyten von HFI-Patienten.

Bei F-2,6-P₂-Spiegeln über 30 μ M läßt sich die Reaktion auf unter 20 % ihrer Aktivität reduzieren, fällt aber nicht mehr linear entsprechend den Hemmstoffkonzentrationen ab. Selbst bei sehr hohem F-2,6-P₂-Gehalt ließ sich die Reaktion nicht gänzlich unterdrücken.

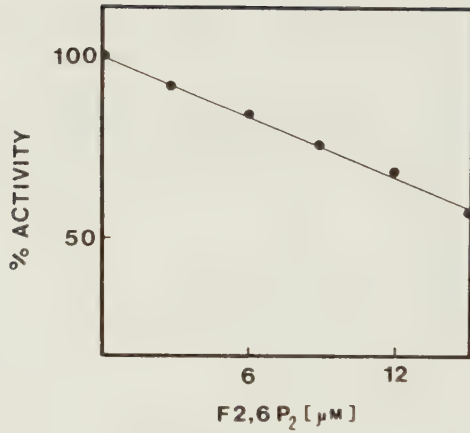


Abb. 13: Aktivitätsabfall der Fruktose-1,6-Bisphosphatase in Leukozyten bei zunehmenden F-2,6-P₂-Konzentrationen

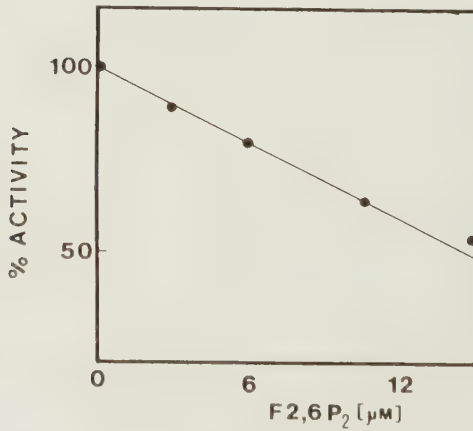


Abb. 14: Aktivitätsabfall der Fruktose-1,6-Bisphosphatase in Hepatozyten (Ratte/Schwein) bei zunehmenden F-2,6-P₂-Konzentrationen

4.2.3 Hemmung der FB Pase-Reaktion durch Leukozyten-extrakt von HFI-Patienten

Durch Zusatz von Leukozytenextrakt aus Blut von HFI-Patienten gelang es uns, die FB Pase-Aktivität im beschriebenen Testansatz sowohl in Lebergewebe als auch in Leukozyten gesunder Kontrollpersonen zu hemmen, wobei die Restaktivität zwischen 40 und 60 % der Ausgangsaktivität, also im gut meßbaren Bereich, lag.

Ebenso wie für die PFK-Reaktion unter 4.1.5 beschrieben, überprüften wir auch hier mit Hilfe eines variierten Testansatzes, ob die gemessene Enzymhemmung tatsächlich auf im Leukozytenextrakt vorhandenes F-2,6-P₂ zurückzuführen ist, oder ob es sich bei dem Effektor um F-6-P handelt.

Zu diesem Zweck ließen wir die Reaktion mit einem Zusatz von 10 µl 10 - 1 mM F-6-P ablaufen, fanden aber selbst bei wiederholten Messungen keine reduzierte FB Pase-Aktivität unter den beschriebenen Testbedingungen. Aus diesem Grunde ist die Wahrscheinlichkeit groß, daß es sich bei dem wirksamen Effektor tatsächlich um F-2,6-P₂ handelt, zumal kein anderer, in ähnlich niedrigen Konzentrationen wirksamer, bekannt ist.

Diese Beobachtung ist umso interessanter, als es uns gelang, mit Leukozytenextrakt eines HFI-Patienten die FB Pase-Reaktion zu hemmen bzw. die PFK-Reaktion zu aktivieren, bei dem selbst keine pathologisch erniedrigte FB Pase-Aktivität gemessen werden konnte.

Möglicherweise normalisiert sich die FB Pase-Aktivität bei diätetisch gut eingestellten Patienten mit wachsen-

dem Alter, obwohl eine erhöhte F-2,6-P₂-Konzentration im Blut vorliegt. Bei unserem Patienten (2 Jahre alt) ergab sich allerdings, wie erwähnt, ein pathologischer Wert für die FBPase in Dünndarmmukosa, und der "normale" Leukozytenwert entstand unter Zuhilfenahme eines pathologischen Proteinwertes in den Leukozyten, was das Ergebnis eventuell in Richtung Normwert verfälscht hat.

4.2.4 Messung des F-2,6-P₂-Gehaltes in Leukozytenextrakt

Analog der F-2,6-P₂-Messung mit Hilfe der PFK-Reaktion bestimmten wir die F-2,6-P₂-Konzentrationen im Blut von HFI-Patienten anhand des Ausmaßes der durch sie hervorgerufenen FBPase-Hemmung.

Je nachdem, ob die Konzentration durch Hemmung der FBPase in Hepatozyten oder in Leukozyten gemessen werden soll, wird eine entsprechende Eichgerade erstellt und zugrundegelegt.

Da gleiche Konzentrationen F-2,6-P₂ die Reaktion in Leukozyten fast im gleichen Ausmaß wie in Hepatozyten hemmen (vgl. Abb. 13 und 14), kann man nicht sagen, welchem Gewebe der Vorzug zur Messung zu geben ist; vom prozentualen Anteil der Restaktivität wird auf die im Probenextrakt enthaltene F-2,6-P₂-Konzentration geschlossen, und auf den Gehalt pro mg Protein oder pro ml Vollblut umgerechnet.

Die Abbildungen 15 und 16 veranschaulichen diesen Vorgang bei Messungen, in denen der Leukozytenextrakt der Patienten die FBPase-Reaktion sowohl in Leukozyten wie auch in Hepatozyten hemmt.

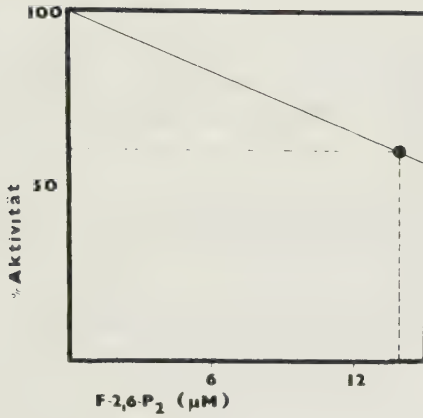


Abb. 15: Messung der F-2,6-P₂-Konzentration in Leukozyten durch das Ausmaß der FBPase-Hemmung in % des Ausgangswertes. Gehemmt wird Leukozyten-FBPase.

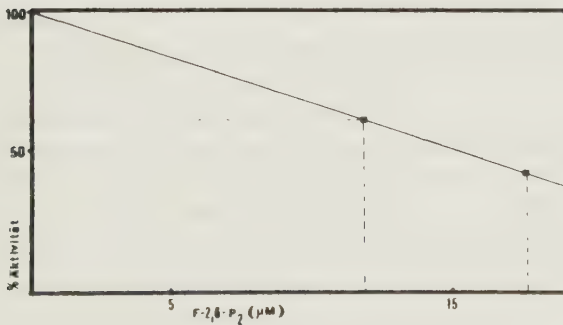


Abb. 16: Messung der F-2,6-P₂-Konzentrationen in Leukozyten durch das Ausmaß der FBPase-Hemmung in % des Ausgangswertes. Gehemmt wird Leber-FBPase.

Aufgrund unserer Versuche ergaben sich für die HFI-Patienten folgende Werte:

Tabelle 6: F-2,6-P₂-Konzentrationen in Leukozyten von HFI-Patienten

Person	Alter	F-2,6-P ₂ (nMol / mg Protein)
HFI 1	5 M	6,8
HFI 2	5 M	13,5
HFI 3	2 J	5,3

Die beiden ersten Messungen wurden mittels Hemmung von Rattenleber-FBPase durchgeführt, die letzte mittels Hemmung von Leukozyten-FBPase.

Es fällt auf, daß der Wert des dritten Patienten nicht so viel unter den übrigen Werten liegt, als daß er eine Erklärung für die normal hohe FBPase-Reaktion derselben Probe liefern könnte.

5. DISKUSSION

5.1 Zur Methodik

Zur Methode der Phosphofruktokinase-Messung in Erythrozyten läßt sich sagen, daß sie bei sachgemäßer Anwendung, speziell im Hinblick auf die sofortige Verwendung des Probenmaterials, sehr genaue Meßergebnisse liefert und relativ einfach und schnell durchführbar ist.

Die Empfindlichkeit für PFK-Aktivitätsschwankungen im physiologischen Bereich ist sogar so groß, daß man wahrscheinlich unterschiedliche PFK-Mangeltypen, wie sie unter 1.4 beschrieben sind, voneinander differenzieren könnte entsprechend dem Ausmaß der Aktivitätsminderung.

Die F-2,6-P₂-Messung anhand der PFK-Aktivierung ist die Methode, die bereits von Sommercorn und Freedland (62) sowie Van Schaftingen und Hers (63) für ihre F-2,6-P₂-Assays gewählt wurde, weil sie F-2,6-P₂-Spiegel sogar im picomolaren Bereich meßbar macht; allerdings wurde in beiden Fällen eine spektrophotometrische Methode angewandt.

Bei unseren Versuchen befand sich, wie bereits beschrieben, im Testansatz von vorneherein eine gewisse Menge F-2,6-P₂, um das aus Potato Tuber extrahierte Enzym überhaupt zu aktivieren. Da die Meßergebnisse den durch die FBPase-Hemmung erzielten ziemlich entsprechen, kann man nicht behaupten, daß die Methode dadurch ungenau geworden sei.

Allerdings ist der Bereich, in welchem sich eine wirklich lineare Eichgerade erstellen läßt, so eng, daß bei

Messungen, die im Testansatz mehr F-2,6-P₂ enthielten, geringere F-2,6-P₂-Werte für das Probenmaterial gemessen wurden als bei denen identischer Proben im niedrigeren F-2,6-P₂-Bereich.

Aus diesem Grund - weil der Punkt der Maximalaktivierung schwer abzuschätzen ist - wäre es möglicherweise sinnvoller, zur F-2,6-P₂-Messung den Grad der FBPase-Hemmung heranzuziehen; in diesem Ansatz befindet sich kein zugesetztes F-2,6-P₂ außer dem im Probenextrakt enthaltenen.

Des weiteren wird die Genauigkeit der F-2,6-P₂-Messung mit Hilfe der PFK-Aktivierung dadurch in Frage gestellt, daß in unserem Testansatz bei Substratkonzentrationen (F-6-P) über 20 mM eine Substrathemmung des Enzyms eintritt. Wir arbeiteten - um diesen Faktor zu eliminieren - mit F-6-P-Konzentrationen von 9 mM; dennoch könnte im Blut von HFI-Patienten etwaig vermehrtes F-6-P vorliegen (F-1-P ist ja regelmäßig erhöht) und ein zu geringes Aktivierungsmaß der PFK vortäuschen.

Im Vergleich dazu hat die F-2,6-P₂-Messung durch FBPase-Hemmung eine größere Breite. Obwohl mit 30 x höheren F-2,6-P₂-Mengen gearbeitet wurde, erzielten wir für gleiche Proben fast identische Ergebnisse wie bei der PFK-Aktivierung, was sehr für die Empfindlichkeit und Genauigkeit der Methode spricht. Da im Testansatz kein synthetisches F-2,6-P₂ zugegeben wird, erreicht man den Punkt der maximalen Hemmung auch erst später, so daß der Meßbereich mit der größten Genauigkeit breiter ist.

Insgesamt läßt sich feststellen, daß die spektrophotometrische Methode der FBPase-Messung in Leukozyten ein-

fach durchzuführen ist und, obwohl sie minimale Extinktionsänderungen entsprechend dem geringen Enzymgehalt mißt, dennoch als genügend empfindlich angesehen werden kann, um geringgradige Enzymhemmung durch zugesetztes F-2,6-P₂ zu quantifizieren.

Entsprechend den 10 - 50 mal höheren Enzymaktivitäten in Muskel- und Leberzellen ist der FBPase-Assay zur Aktivitätsbestimmung dieser Gewebe ebenfalls geeignet und ausreichend.

5.2 Zu den Ergebnissen

Von unseren HFI-Patienten untersuchte Leukozyten zeigten bei zwei Säuglingen eine erniedrigte FBPase-Aktivität, in einem Fall einen Normalwert (Alter des Kindes: 2 Jahre); letzterer errechnete sich allerdings unter Zugrundelegung eines sehr niedrigen Proteingehaltes dieser Leukozyten, so daß dieses Ergebnis eventuell verfälscht ist.

Ob die dazugehörigen Leukozyten-F-2,6-P₂-Werte höher als vergleichbare Normalwerte sind, und damit die Ursache der verringerten FBPase-Aktivität darstellen, muß fraglich bleiben, weil bisher in der Literatur keine Normwerte für F-2,6-P₂ in Leukozyten angegeben wurden (siehe auch 1.4.1).

Auch uns gelang es nicht, verläßliche Normwerttabellen herzustellen, da die in Kontroll-Leukozyten gesunder

Probanden vorhandene Konzentration an F-2,6-P₂ vermutlich zu gering ist, um die PFK-Reaktion im verwendeten Meßbereich signifikant zu aktivieren bzw. die FB Pase-Reaktion zu hemmen.

Verglichen mit Normwerten anderer Autoren in humanen und Rattenhepatozyten (50 und 51) erscheinen die gemessenen Konzentrationen in Patientenleukozyten allerdings relativ hoch.

Leider war es uns unmöglich, Leberbiopsiegewebe von fruktoseintoleranten Kindern zu bekommen, um die FB Pase-Aktivität auch hierin zu messen.

Daß bei unseren Messungen die Enzymhemmung durch etwaig vermehrtes F-6-P bzw. G-6-P verursacht wurde, konnten wir ausschließen. Unklar bleibt allerdings, warum die FB Pase-Aktivität nicht bei allen Patienten erniedrigt war; ein der hereditären Fruktose-Intoleranz assoziierter FB Pase-Mangel, eine eigenständige Stoffwechselstörung also, in zwei von drei Fällen von HFI ist aus statistischen Gründen sehr unwahrscheinlich.

Als Begründung für diese unterschiedlichen Ergebnisse ließe sich anführen, daß bei jungen Säuglingen - etwa zum Zeitpunkt der HFI-Diagnosestellung, also im Alter von unter 6 Monaten - die orale Fruktosezufuhr sicher auch deshalb eine besonders große Rolle spielt, weil der gesamte Fruktosestoffwechsel noch labiler ist als bei älteren Kindern und entsprechende Regulationsmechanismen noch nicht so funktionstüchtig sind. Damit kommt es leichter zu einem Anstau verschiedener Metaboliten und vermindert bzw. vermehrt ablaufenden Einzelreaktionen; die erniedrigte FB Pase-Aktivität in unseren Patien-

tenleukozyten mag dadurch miterklärt sein. Der primäre Enzymdefekt und ein in den ersten Lebensmonaten noch instabiler Fruktosemetabolismus könnten sich in ihrer Wirkung verstärken und die Enzymaktivitätsschwankungen in Abhängigkeit von der oralen Fruktosezufuhr begründen.

Möglicherweise ist es so, daß sich bei diätetisch gut eingestellten HFI-Patienten die FBPase-Aktivität auf die Dauer wieder normalisiert, da ja entsprechend dem geringeren Fruktoseangebot auch weniger Hexosemonophosphate sich anstauen und die Stoffwechsellage im großen und ganzen der eines Gesunden gleicht, wenn sie auch empfindlicher bleibt.

Die komplizierte Art und Weise, in der $F-2,6-P_2$ in den Glukose- und Glykogenstoffwechsel eingreift (siehe auch 1.4.3), lassen es denkbar erscheinen, daß minimale Schwankungen der Glukose-, Insulin- und Adrenalin-Konzentrationen bereits eine $F-2,6-P_2$ -Erhöhung herbeiführen (so wie höhere Glukagonspiegel eine Erniedrigung) und damit die FBPase-Aktivität eines Testansatzes trotzdem noch regulieren.

Auch die Tatsache, daß die bei uns gemessenen PFK-Werte in Leukozyten von HFI-Patienten nicht erhöht waren, sondern im Normbereich lagen, schließen eine $F-2,6-P_2$ -Erhöhung im Blut dieser Patienten nicht aus.

So wie $F-2,6-P_2$ zuerst als Effektor der FBPase-Reaktion gefunden wurde und später erst als Aktivator der PFK, mag auch in vivo die FBPase-Reaktion empfindlicher auf Konzentrationsschwankungen dieses Effektors reagieren.

Genau dies entspricht auch unseren Ergebnissen bei dem

PFK-Assay, wo ja unterhalb einer bestimmten F-2,6-P₂-Konzentration überhaupt keine Enzymaktivität meßbar war. Daß es aber wahrscheinlich das im Patientenblut enthaltene F-2,6-P₂ war, welches dieselbe PFK-Aktivität steigerte, wurde bereits herausgestellt.

Falls tatsächlich bei jungen HFI-Patienten ein erhöhter Blutspiegel von F-2,6-P₂ vorliegt, könnte man dieses auf ein gesteigertes Substratangebot für die Fruktose-6-Phosphat-2-kinase zurückführen, was ja bei den bekanntermaßen hohen Hexosemonophosphatkonzentrationen durchaus denkbar wäre.

Das vermehrte F-2,6-P₂ würde dann im Sinne einer Steigerung der Glykolyserate und Hemmung der Glukoneogenese die bestehende Hypoglykämie verstärken und damit die Symptomatik verschlimmern.

Allerdings ist der Regulationsmechanismus von F-2,6-P₂ in Hinsicht auf den Glukose- und Glykogenstoffwechsel so vielfältig und diffizil, daß es in vitro sehr schwierig sein dürfte, aus den minimalen Schwankungen dieses Effektors diagnostische Schlüsse zu ziehen.

Für weitere Untersuchungen erscheint es in jedem Fall vorrangig, Normbereiche für F-2,6-P₂-Spiegel in verschiedenen humanen Geweben einschließlich Leukozyten zu messen und die Einflüsse der von den zitierten Autoren beschriebenen Metaboliten auf diese Normbereiche zu untersuchen und zu quantifizieren. Erst damit wird es möglich sein, konkrete Aussagen bezüglich einer Erhöhung der F-2,6-P₂-Werte im Blut von HFI-Patienten zu machen und diese Werte diagnostisch zu verwenden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Untersuchung von Enzymaktivitäten fruktoseintoleranter Kinder fanden wir eine Erniedrigung der Leukozyten-FBPase neben dem primären Enzymdefekt. Die Entdeckung von F-2,6-P₂ 1979 (47) als dem potentesten bekannten Effektor des Glukosestoffwechsels durch Hemmung der FBPase-Reaktion bzw. Aktivierung der PFK-Reaktion legte die Hypothese nahe, bei HFI-Patienten könne die erniedrigte FBPase-Aktivität auf eventuell angereichertes F-2,6-P₂ zurückzuführen sein.

Um dies zu überprüfen, entwickelten wir einen Assay zur spektrophotometrischen FBPase-Messung in Leukozyten und Darmmukosa sowie eine Methode zur PFK-Bestimmung in Erythrozyten und Muskelgewebe durch Ionensäulenaustausch-Chromatographie von Isotopen.

Beide Methoden erwiesen sich als so empfindlich im Bereich physiologischer Substratkonzentrationen, daß man sie auch zur Messung einer unbekannten F-2,6-P₂-Konzentration entsprechend dem Ausmaß ihrer Aktivitätsminderung (FBPase) bzw. -steigerung (PFK) verwenden kann.

Die PFK-Bestimmung ermöglicht zusätzlich die Diagnose einer Glykogenspeicherkrankheit Typ VII ('Tarui's disease'), bei welcher die Aktivität der Erythrozyten-PFK auf ca. 50 % der Norm erniedrigt ist.

Bei den zwei jüngeren von drei untersuchten HFI-Patienten (beides junge Säuglinge), fanden wir eine auf ca. 20 % der Norm erniedrigte Leukozyten- und Darmmukosa-FBPase. Mit Leukozytenextrakt von allen drei Kindern gelang es uns, die PFK-Reaktion in Erythrozyten zu ak-

tivieren wie auch die FBPase-Reaktion in Kontroll-Leukozyten sowie in Hepatozyten zu hemmen. Die für beide Methoden errechneten F-2,6-P₂-Konzentrationen in den Patientenleukozyten entsprachen sich. Daß die jeweiligen Veränderungen der Enzymaktivitäten auf die Gegenwart anderer physiologischer Effektoren wie z.B. Hexosemonophosphate zurückzuführen war, konnte ausgeschlossen werden.

Da bei unserem ältesten Patienten, einem zweijährigen Kleinkind, die FBPase-Reaktion nicht erniedrigt gefunden wurde, mit seinem Leukozytenextrakt jedoch sowohl die Erythrozyten-PFK aktiviert wie auch die FBPase in Kontroll-Leukozyten gehemmt werden konnte, stellt sich die Frage, ob sich bei 'diätetisch gut eingestellten' Kindern die F-2,6-P₂-Werte wieder im Normbereich bewegen und minimale Effektorschwankungen die Testergebnisse *in vitro* verfälschen.

Bei der komplizierten Weise, auf die F-2,6-P₂ in den Glukose- und Glykogenmetabolismus eingreift, wäre es auch denkbar, daß die erhöhte Stoffwechsellabilität bei jungen Säuglingen durch Schwankungen der Glukose-, Insulin- und Adrenalin-Konzentrationen via F-2,6-P₂ die Aktivität der FBPase reguliert, so daß man letztere nicht ohne weiteres als diagnostisches Kriterium für HFI heranziehen sollte.

Von entscheidender Wichtigkeit für die Bedeutung der F-2,6-P₂-Konzentration in Leukozyten von HFI-Patienten wäre somit die Messung von F-2,6-P₂ in Abhängigkeit vom Alter des Patienten und ihrer diätetischen Einstellung, wofür sich unsere Methoden der FBPase- und der PFK-Bestimmung gut eignen dürften.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) GITZELMANN R, STEINMANN B, VAN DEN BERGHE G:
Essential fructosuria, hereditary fructose intolerance and fructose-1,6-diphosphatase deficiency. In: The metabolic basis of inherited disease: 120 ff, Mc Graw Hill Book Comp. 1983.
- 2) COOK G C: Absorption and metabolism of D-fructose in man. Am J Clin Nutr 24: 1302-1307, 1971.
- 3) HONEGGER P, SEMENZA G: Multiplicity of carriers for free glucalogues in hamster small intestine. Biochim Biophys Acta 318: 390 - 410, 1973.
- 4) MACRAE A R, NEUDOERFER T S: Support for the existence of an active transport mechanism of fructose in the rat. Biochim Biophys Acta 288: 137 - 144, 1972.
- 5) HOLDSWORTH C D: Absorption of fructose in man. Proc Soc Exp Biol Med 118: 142 - 145, 1965.
- 6) HERS H G: La fructokinase du foie. Biochim Biophys Acta 8: 316 - 423, 1972.
- 7) WOODS H F, EGGLESTON L V: The cause of hepatic accumulation of F-1-P on fructose-loading. Biochem J 119: 501 - 510, 1970.
- 8) HERS H G: Le métabolisme du fructose. Editions Arscia, Brussels 1957.

- 9) SOLS A, CRANE R K: Substrate specificity of brain hexokinase. J Biol Chem 210: 581 - 595, 1954.
- 10) PERHEENTUPA J: Fructose-induced hyperuricaemia. Lancet 2: 528 - 531, 1967.
- 11) BERGSTRÖM J: Lactic acid accumulation in connection with fructose infusion. Acta Med Scand 184: 359 - 364, 1968.
- 12) FRANDSEN E K: Kinetic properties of triokinase from rat liver. Eur J Biochem 23: 588 - 592, 1971.
- 13) HESSOV I: Effects of fructose and glucose infusions on blood acid base equilibrium in the post-operative period. Acta Chir Scand 140: 347 - 351, 1974.
- 14) SAHEBJAMI D: Effects of fructose infusion on lactate and uric acid metabolism. Lancet 1: 366 - 369, 1971.
- 15) EGGLESTON L V: Activation of liver pyruvate kinase by fructose - 1 - P. FEBS Lett 6: 43 - 45, 1970.
- 16) HARPER H, LÖFFLER G, PETRIDES P, WEISS L: Intermediärstoffwechsel II: Kohlenhydrate. In: Physiologische Chemie: 350, Springer Verlag Heidelberg New York 1979.
- 17) CHAMBERS R A, PRATT R: Idiosyncrasy to fructose. Lancet 2: 340, 1955.

- 18) ASAKA M, MIYAZAKI T, BLAINE HOLLINGER F, ALPERT E:
Human aldolase B serum levels: A marker of
liver injury. *Hepatology* 4: 531 - 535, 1984.
- 19) RUTTER W J, RAJUKUMAR T, PENHOET E: Aldolase variants:
Structure and physiological significance.
Am Acad Sci 151: 102 - 117, 1968.
- 20) ZALITIS J: Inhibition of glucose phosphate iso-
merase by metabolic intermediates of fructose.
Biochem J 102: 753 - 759, 1967.
- 21) VAN DEN BERGHE G, HUE L: Effect of the administration
of fructose on the glycogenolytic action of
glucagon. An investigation of the pathogeny of
hereditary fructose intolerance. *Biochem J* 134:
637 - 645, 1973.
- 22) MEEK D W, NIMMO H G: Effects of phosphorylation
on the kinetic properties of rat liver fruc-
tose-1,6-bisphosphatase. *Biochem J* 222: 125 -
130, 1984.
- 23) WESTBURY K: Fructose-1,6-bisphosphatase activity
in the intestinal mucosa of developing rats.
Am Physiol Soc G 684: 683 - 685, 1984.
- 24) MEEK D W, NIMMO H G: The interaction of fructose-
2,6-bisphosphate with an allosteric site of
rat liver fructose-1,6-bisphosphatase. *FEBS*
0694: 105 - 109, 1983.
- 25) MC CRANE M, PILKIS S J: The interaction of fructose-
2,6-bisphosphate and AMP with rat hepatic fruc-
tose-1,6-bisphosphatase. *J Biol Chem* 258:
10445 - 10454, 1983.

- 26) CHATTERJEE T, EDELSTEIN I, MARCUS F: Identification of the highly reactive sulfhydryl group of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase at cystein 128. J Biol Chem 259: 3834 - 3837, 1984.
- 27) CHATTERJEE T, RITTENHOUSE J, MARCUS F: Identification of the in vivo and in vitro phosphorylation sites of rat liver fructose-16,-bisphosphatase. J Biol Chem 259: 3831-3833, 1984.
- 28) VAN SCHAFTINGEN E, HERS H G: Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose-2,6-bisphosphate. Proc Natl Acad Sci 78: 2861 - 2863, 1981.
- 29) TAKETA K, POGELL B M: A fructose-1,6-bisphosphate assay. J Biol Chem 240: 651 - 662, 1965.
- 30) MEEK D W, NIMMO H G: The allosteric properties of rat liver fructose-1,6-bisphosphatase. Bioch J 222: 131 - 138, 1984.
- 31) CORREDOR C, BOSCA L, SOLS A: Biphasic effect of fructose-2,6-bisphosphate on the liver fructose-1,6-bisphosphatase: mechanistic and physiological implications. FEBS 1238: 199 - 201, 1984.
- 32) MIZUNUMA H, TASHIMA Y: Effect of Mn^{2+} on fructose-2,6-bisphosphate inhibition of mouse liver, intestinal, and muscle fructose-1,6-bisphosphatase. Arch Biochem Biophys 226: 257 - 264, 1983.

- 33) TARUI S, OKUNO G, IKURA Y, TANAKA T: Phosphofructokinase deficiency in skeletal muscle, a new type of glycogenosis. *Biochem Biophys Res Comm* 19: 517 - 520, 1965.
- 34) GUIBAUD P, CARRIER H, MATTHIEU M, DORCHE C1, PARCHOUX B: Observation familiale de dystrophie musculaire congenitale par déficit en phosphofructokinase. *Arch franc Pédiat* 35: 1105 - 1115, 1978.
- 35) TARUI S, KONO N, NASU T, NISHIKAWA M: Enzymatic basis for the coexistence of myopathy and hemolytic disease in inherited muscle phosphofructokinase deficiency. *Biochem Biophys Res Comm* 34: 77 - 85, 1969.
- 36) SHIMIZU T, KONO N: Kinetic properties of erythrocyte phosphofructokinase in patients with type VII glycogenosis from two families - close similarity to liver type phosphofructokinase. *J Inher Metab Dis* 7: 107 - 111, 1984.
- 37) KAHN A, MEIENHOFER M C, COTTREAU D, LAGRANGE J L: Phosphofructokinase isoenzymes in man. *Hum Genet* 48: 93 - 108, 1979.
- 38) VORA S, CORASH L: The molecular mechanism of the inherited phosphofructokinase deficiency associated with hemolysis and myopathy. *Blood* 55: 629 - 635, 1980.
- 39) OKUNO G: Activities of glycogen synthetase and UDPG-pyrophosphorylase in muscle of a patient

with a new type of muscle glycogenosis caused by phosphofructokinase deficiency. *Nature* 212: 1490 - 1491, 1966.

- 40) ROSELL-PEREZ M: Sixth international congress of biochemistry. New York, abstract 6: 98, 1964.
- 41) MUNIYAPPA K: Binding and regulatory properties of phosphofructokinase from swine kidney. *Mol Cell Biochem* 63: 21 - 32, 1984.
- 42) PATTEN G S: Ca^{2+} mediated activation of phosphofructokinase in perfused rat heart. *Biochem J* 216: 717-725, 1983.
- 43) UYEDA K, FURUYA E: The effect of natural and synthetic D-fructose-2,6-bisphosphate on the regulatory kinetic properties of liver and muscle phosphofructokinases. *J Biol Chem* 256: 8394 - 8399, 1981.
- 44) NISSLER K, OTTO A, SCHELLENBERGER W, HOFMANN E: Cooperation of fructose-2,6-bisphosphate and AMP in the activation of yeast phosphofructokinase. *Biomed Biochim Acta* 43: 535 - 540, 1984.
- 45) VAN SCHAFTINGEN E, HUE L: Control of liver-6-phosphofructokinase by fructose-2,6-bisphosphate and other effectors. *Proc Natl Acad Sci* 78: 3483 - 3486, 1981.
- 46) TEJEDOR M C: Kinetic behaviour and regulatory properties of phosphofructokinase in rat bone marrow cells. *Biochem Intern* 9: 577 - 586, 1984.

- 47) VAN SCHAFTINGEN E, HUE L, HERS H G: Control of the fructose-6-phosphate / fructose-1,6-bisphosphate cycle in isolated hepatocytes by glucose and glucagon. *Biochem J* 192: 887 - 895, 1980.
- 48) KUWAJIMA M, NEWGARD C B: Time course and significance of changes in hepatic fructose-2,6-bisphosphate levels during refeeding of fasted rats. *J Clin Invest* 74: 1108 - 1111, 1984.
- 49) PILKIS S J, EL-MAGHRABI R: Fructose-2,6-Bisphosphate. *J Biol Chem* 256: 3171 - 3174, 1981.
- 50) HUE L, BLACKMORE P: Regulation of fructose-2,6-bisphosphate content in rat hepatocytes, perfused hearts and perfused hindlimbs. *J Biol Chem* 257: 4308 - 4313, 1982.
- 51) HUE L, BLACKMORE P: Fructose-2,6-bisphosphate *J Biol Chem* 256: 8900 - 8903, 1981.
- 52) NYFELER F, MC CAIN R W: Pentobarbital anesthesia decreases fructose-2,6-bisphosphate levels in rat liver. *Biochem Biophys Res Comm* 122: 1154 - 1159, 1984.
- 53) HERS H G, VAN SCHAFTINGEN E: Fructose-2,6-bisphosphate two years after its discovery. *Biochem J* 206, 1 - 12, 1982.
- 54) EL-MAGHRABI M R, PILKIS S J: Differential effects of proteolysis and protein modification on the activities of phosphofructokinase 2 /

- fructose-2,6-bisphosphatase. J Biol Chem 259: 13096 - 13103, 1984.
- 55) PILKIS S J, WALDERHAUG M: 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from rat liver. J Biol Chem 258: 6135 - 6141, 1983.
- 56) SAKAKIBARA R, UYEDA K: Limited proteolysis and photoaffinity labeling with 8-azido-ATP of fructose-6-phosphate-2-kinase and fructose-2,6-bisphosphatase. J Biol Chem 259: 8366 - 8371, 1984.
- 57) RIDER M H, HUE L: Activation of rat heart phosphofructokinase-2 by insulin in vivo. FEBS Lett 1955: 484 - 488, 1984.
- 58) SHIN-BUEHRING Y S, ZIEGLER R, OSANG M, SCHAUB J: A simple assay for galactokinase using DEAE-cellulose column chromatography. Clin Chim Acta 74: 1 - 5, 1977.
- 59) SHIN Y S, MORO V, DOLIWA H, ENDRES W: A radioisotopic method for fructose-1-phosphate aldolase assay that facilitates diagnosis of hereditary fructose intolerance. Clin Chem 29: 1955 - 1958, 1983.
- 60) STAUB A, VESTLING C S: Studies on fructose-1-phosphate with rat liver phosphofructokinase. J Biol Chem 194: 395 - 399, 1951.
- 61) LOWRY D H, ROSEBROUGH N J: Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265 - 275, 1951.

- 62) SOMMERCORN J, FREEDLAND R A: Effects of diets on concentrations of 6-phosphogluconate and fructose-2,6-bisphosphate in rat livers and an assay of fructose-2,6-bisphosphate with an improved method. J Nutr 114: 1462 - 1469, 1984.

- 63) VAN SCHAFTINGEN E, HERS H G: Kinetic study of pyrophosphate: Fructose-6-phosphate phosphotransferase in potato tubers. J Biol Chem 129: 191 - 195, 1982.

- 64) BAKER L, WINEGRAD A: Fasting hypoglycemia and metabolic acidosis with deficiency of hepatic fructose-1,6-bisphosphatase activity. Lancet 2: 13, 1970.

L E B E N S L A U F

Monika Schindler

- 31.5.1959: geb. als erstes von 3 Kindern des
prakt. Arztes Dr. med. Wolfgang
Schindler und seiner Ehefrau Gisela,
geb. Schwarz, in München
- 1965 - 1969: Besuch der Volksschule
- 1969: Übertritt in das Kurt-Huber-Gymnasium,
Gräfelfing
- 1978: Abitur
- 1978 - 1979: Studium der Germanistik und Literatur-
wissenschaft an der LMU München
- 1979: Beginn des Medizinstudiums
in München
- 1981: Physikum
- 1982: 1. Teil des Staatsexamens
- 1984: 2. Teil des Staatsexamens, anschl.
Beginn der Dissertation im
von Haunerschen Kinderspital München
- 1985 - 1986: Praktisches Jahr
- April 1986: Letzter Teil des medizinischen
Staatsexamens

